

ANA ANDRÉA TEIXEIRA DE CARVALHO

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DE BOVICINA HC5 SOBRE BACTÉRIAS
DETERIORADORAS DE POLPA DE MANGA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C331a
2006

Carvalho, Ana Andréa Teixeira de, 1977-

Atividade inibitória de bovicina HC5 sobre bactérias
deterioradoras de polpa de manga / Ana Andréa Teixeira
de Carvalho. – Viçosa : UFV, 2006.
xv, 72f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 55-64.

1. Bacteriocinas. 2. Alimentos - Conservação. 3. Polpa
de manga - Microbiologia. 4. *Clostridium Tyrobutyricum*.
5. *Bacillus cereus*. 6. *Bacillus Thuringiensis*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.355

ANA ANDRÉA TEIXEIRA DE CARVALHO

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DE BOVICINA HC5 SOBRE BACTÉRIAS
DETERIORADORAS DE POLPA DE MANGA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de abril de 2006

Prof^a Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof^a Maria Cristina Dantas Vanetti
(Conselheira)

Prof^a Miriam Teresinha dos Santos

Prof^a Nilda de Fátima Ferreira Soares

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Orientador)

“Graças, porém, a Deus, que, em Cristo, sempre nos conduz em triunfo e, por meio de nós, manifesta em todo lugar a fragrância do seu conhecimento”

(II Coríntios, 2:14).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada é possível, até para aqueles que não acreditam em sua existência. Agradeço não somente pelo o que Ele fez, faz ou irá fazer em minha vida, mas pelo o que Ele é, infinito em sua bondade, misericórdia e amor. Agradeço por sua presença constante em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço à minha mãe, que me deu suporte e incentivo durante todas as etapas de minha vida, e também ao meu pai, que apesar de não estar mais presente tenho certeza que estaria muito orgulhoso. Agradeço também a todos os meus irmãos, cunhados e cunhadas e sobrinhos.

Agradeço ao Leandro, amor de minha vida, pela paciência, compreensão, companheirismo e pelo amor incondicional que amenizou as dificuldades encontradas para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Hilário pela orientação, dedicação, disponibilidade e incentivo, minha eterna gratidão e admiração. Orientador na palavra exata da palavra me mostrou o verdadeiro significado da palavra “pesquisa”. Cresci muito enquanto pesquisadora trabalhando ao lado dele.

À professora Célia pelo incentivo e oportunidade de trabalhar na área de microbiologia. Agradeço também à professora Cristina pela disponibilidade, apoio e aconselhamento que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À professora Nilda do DTA, por ter disponibilizado a nisina para a realização deste trabalho e também por participar da banca de defesa.

À professora Miriam pela participação na banca de defesa e pelas sugestões.

Às professoras Maria de Fátima Lopes e Alice Inês Oliveira e Silva pela orientação na iniciação científica no departamento de Economia Doméstica, cujos ensinamentos me ajudaram muito na condução do mestrado.

Agradeço à Néia pela amizade e por ter me ensinado a dar os primeiros passos na área de microbiologia. Agradeço aos amigos da MIND: Alessandra e José Carlos, pelos momentos de alegria e tristeza compartilhados, ao Léo baiano, pela força e incentivo e também à Fernanda, Eliana, Inês, Thiago, Ana Paula e Marta.

Aos amigos do Anaeróbios: Rafael, Fernanda, Aline, Cláudia, Isabela, Marcelo, André, Marcelão e Janaína pela força e incentivo e pelos momentos de descontração. Agradeço à Esther pela ajuda, amizade e pelos “isolados”. À Simone, Elizethe, Bete, Flávia, Emilene e Adriana por tornarem a convivência no laboratório tão agradável. Todos vocês foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também às meninas da secretaria, Nilcéa, Dona Aparecida e Laura e aos funcionários José Carlos, Sr. Cesário, Pablo, Sr. Paulo, Evandro e Danilo.

À todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANA ANDRÉA TEIXEIRA DE CARVALHO, filha de Jésus Teixeira de Carvalho e Maria Teixeira Gomes, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em 10 de maio de 1977.

Graduou-se em Janeiro de 2004, Licenciada e Bacharel em Economia Doméstica pela Universidade Federal de Viçosa.

Iniciou em Agosto de 2004, o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Processamento e deterioração de polpas e sucos de fruta	3
2.1.1. Contaminação e processamento	3
2.1.2. Microrganismos deterioradores de produtos tratados termicamente	4
2.2. Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico	7
2.2.1. Classificação	7
2.2.2. Síntese e transporte	8
2.2.3. Mecanismo de ação	10
2.2.4. Imunidade das células produtoras de bacteriocinas	12
2.2.5. Mecanismos de resistência	13
2.2.6. Utilização de bacteriocinas em alimentos	13
2.3. Bovicina HC5	15

3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Preparo da polpa de manga	17
3.2. Microrganismos e condições de cultivo e estocagem	17
3.3. Obtenção de endosporos bacterianos	20
3.4. Caracterização dos isolados anaeróbios facultativos deterioradores de polpa de manga	20
3.5. Preparo e determinação da atividade de bovicina HC5	22
3.6. Preparo e determinação da atividade de nisina	23
3.7. Determinação da estabilidade de bovicina HC5 no sobrenadante dos isolados da polpa de manga deteriorada	23
3.8. Efeito de bovicina HC5 sobre células vegetativas dos isolados de polpa de manga em caldo BHI	24
3.9. Efeito do pH na atividade de bovicina HC5 sobre células vegetativas inoculadas em polpa de manga diluída	24
3.10. Efeito da bovicina HC5 sobre a produção de gás pelos isolados anaeróbios estritos	25
3.11. Efeito da bovicina HC5 sobre a germinação de esporos dos isolados anaeróbios facultativos	26
3.12. Determinação do valor <i>D</i> de esporos em polpa de manga diluída	26
3.13. Avaliação do desenvolvimento de resistência dos isolados da polpa de manga à bovicina HC5	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados anaeróbios facultativos	28
4.2. Estabilidade de bovicina HC5 no sobrenadante dos isolados e em polpa de manga	28
4.3. Efeito da bovicina HC5 contra células vegetativas inoculadas em caldo BHI	30
4.4. Efeito da bovicina HC5 sobre células vegetativas inoculadas em polpa de manga diluída	32

4.5. Efeito da bovicina HC5 sobre a produção de gás por células vegetativas inoculadas em polpa de manga diluída	36
4.6. Efeito da bovicina HC5 sobre a germinação de esporos dos isolados anaeróbios facultativos	40
4.7. Efeito da bovicina HC5 na resistência térmica de esporos inoculados em polpa de manga diluída	40
4.8. Desenvolvimento de resistência à bovicina HC5	45
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICE	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Logaritmo do número de células viáveis dos isolados *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c) inoculados (10^6 UFC/mL) em polpa de manga diluída com diferentes valores de pH. 34
- Figura 2.** Logaritmo do número de células viáveis de *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c) inoculados (10^6 UFC/mL) em polpa de manga diluída com diferentes valores de pH. 35
- Figura 3.** Efeito bactericida de bovicina HC5 e nisina contra *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c) em polpa de manga diluída com pH ajustado para 4,0. 37
- Figura 4.** Efeito bactericida de bovicina HC5 e nisina contra *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c) em polpa de manga diluída com pH ajustado para 4,0. 38
- Figura 5.** Efeito de 100 UA/mL de bovicina HC5 sobre a produção de gás por *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c). 39

- Figura 6.** Efeito da bovicina HC5 na germinação de esporos dos isolados *B. thuringiensis* LMA09 (d), *B. thuringiensis* LMA65 (e) e *B. cereus* LMA19 (f). 41
- Figura 7.** Número de esporos viáveis de *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c) inoculados em polpa de manga diluída. 42
- Figura 8.** Curva de sobrevivência de esporos de *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c). 44
- Figura 9.** Efeito de doses subletais de bovicina HC5 no desenvolvimento de resistência por *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c). 46
- Figura 10.** Efeito de doses subletais de bovicina HC5 no desenvolvimento de resistência por *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c). 47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação de microrganismos Gram-positivos utilizados neste estudo. 19
- Tabela 2.** Características bioquímicas e morfológicas dos isolados de *Bacillus* da polpa de manga deteriorada. Resultados típicos para *B. cereus* e *B. thuringiensis* descritos no Manual de Bergey também são mostrados. 29
- Tabela 3.** Efeito do sobrenadante de bactérias isoladas de polpa de manga deteriorada e de enzimas proteolíticas sobre a bovicina HC5. *L. lactis* ATCC 19435 foi utilizado como microrganismo indicador. 30
- Tabela 4.** Efeito de diferentes concentrações de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de células vegetativas inoculadas em caldo BHI. 31
- Tabela 5.** Tempo de redução decimal ($D_{80^{\circ}C}$) de esporos bacterianos em polpa de manga diluída (pH 4,0) sem bacteriocina (controle) e na presença de bovicina HC5 e nisina. 43

RESUMO

CARVALHO, Ana Andréa Teixeira de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, abril de 2006. **Atividade inibitória de bovicina HC5 sobre bactérias deterioradoras de polpa de manga.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Conselheiras: Célia Alencar de Moraes e Maria Cristina Dantas Vanetti.

Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico têm sido propostas como alternativa aos métodos tradicionais de conservação de alimentos, como tratamento térmico, que interferem nas características naturais do alimento. A nisina é a bacteriocina que tem sido mais utilizada em alimentos. Recentemente, uma nova bacteriocina, bovicina HC5 produzida por *Streptococcus bovis* HC5, foi caracterizada e apresentou efetividade contra *Listeria monocytogenes* e *Clostridium sporogenes*. Neste estudo, a atividade desta bacteriocina foi testada contra *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e linhagens de *Clostridium tyrobutyricum* isolados da polpa de manga deteriorada. A adição de 40 a 160 UA/mL de bovicina HC5 em caldo BHI resultou na diminuição da velocidade específica de crescimento e da DO máxima atingida por *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *C. tyrobutyricum*. Concentrações de 40 e 80 UA/mL de bovicina HC5 resultaram no aumento da fase lag dos isolados em pelo menos 10 h e quando a concentração utilizada foi de 160 UA/mL, o crescimento não foi observado por, pelo menos, 144 h. Concentração de 100 UA/mL de bovicina HC5 foi bactericida para células vegetativas inoculadas em

polpa de manga e este efeito foi mais pronunciado em condições acídicas. Após 24 horas de incubação na presença da bacteriocina, o número de células viáveis das bactérias avaliadas ficou abaixo do limite de detecção. Resultados semelhantes foram obtidos com a nisina. Quando as linhagens de *C. tyrobutyricum* foram inoculadas em polpa de manga contendo 100 UA/mL de bovicina HC5, a produção de gás não foi observada por até 10 dias de incubação. Bovicina HC5 reduziu a germinação de esporos de *B. cereus* e *B. thuringiensis* e o número de esporos no estado dormente após 122 h de incubação foi, pelo menos, 100 vezes maior do que o observado no tratamento controle, sem bacteriocina. Esta bacteriocina não teve efeito na resistência térmica de esporos de *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Entretanto, uma vez que a bovicina HC5 apresenta resistência a altas temperaturas (121 °C/20 min), ela pode permanecer estável na polpa de manga após o tratamento térmico e reduzir a germinação dos esporos sobreviventes. A transferência dos isolados por, aproximadamente, 40 gerações na presença de 20 UA/mL de bovicina HC5 não causou adaptação dos microrganismos deterioradores. Esta bacteriocina permaneceu estável após incubação em mistura com o sobrenadante das culturas e com a polpa de manga. Considerando os resultados obtidos neste trabalho, a bovicina HC5 parece ser útil para reduzir a deterioração de polpa de manga causada por *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *C. tyrobutyricum*.

ABSTRACT

CARVALHO, Ana Andréa Teixeira de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, April, 2006. **Inhibitory activity of bovicin HC5 against spoilage bacteria from mango pulp.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Committee members: Célia Alencar de Moraes and Maria Cristina Dantas Vanetti.

Bacteriocins from lactic acid bacteria have been suggested as an alternative to traditional food preservation methods, such as heat treatment, that interfere with natural characteristics of the food. Nisin is the bacteriocin that has been most used in foods. Recently, a new bacteriocin, bovicin HC5, produced by *Streptococcus bovis* HC5, was characterized. Previous work indicated that this bacteriocin has activity against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium sporogenes*. In this study, the activity of this bacteriocin was tested against *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. The addition of bovicin HC5 (40 to 160 AU/mL) into BHI media resulted in reduced specific growth rate and maximal optical densities of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *C. tyrobutyricum*. Concentrations of 40 and 80 AU/mL increased lag phase duration for at least 10 h. When 160 AU/mL was used, growth was not observed even after 144 h. The effect of bovicin HC5 against vegetative cells inoculated into mango pulp was bactericidal and more pronounced at acidic conditions. After 24 h of incubation with the bacteriocin, the viable cell number was below the detection level. Similar results were obtained when nisin was used. When *C. tyrobutyricum*

was inoculated into mango pulp with 100 AU/mL of bovicin HC5, gas production was not observed for at least 10 days of incubation. Bovicin HC5 reduced spore germination of *B. cereus* and *B. thuringiensis* inoculated into mango pulp, and the number of non-germinated spores after 122 h of incubation was at least 100-fold greater than control treatments. Bovicin HC5 did not affect the thermal resistance of *B. cereus* and *B. thuringiensis* spores. However, if added to the mango pulp, bovicin HC5 could remain stable during the heat treatment, and reduce spore germination of these microorganisms. Cultures of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *C. tyrobutyricum* that were transferred successively in the presence of sublethal doses of bovicin HC5 did not become resistant. Considering the results obtained in this study and the fact that bovicin HC5 was stable in culture supernatants and in mango pulp, it seems that this bacteriocin could be useful to prevent the spoilage of mango pulp by *B. cereus*, *B. thuringiensis* and *C. tyrobutyricum*.

1. INTRODUÇÃO

A manga é uma fruta tropical que possui grande demanda no mercado mundial, sendo consumida tanto *in natura* quanto na forma processada. Atualmente, o Brasil é o oitavo maior exportador mundial de manga e esta atividade tem aumentado nos últimos anos. A exportação de frutas processadas na forma de sucos, polpas, doces e néctares têm sido maior em relação a frutas *in natura* devido ao valor agregado e maior prazo de validade desses produtos.

O processamento de polpas e sucos de frutas é geralmente feito por meio do tratamento de pasteurização. Esse tratamento térmico é suficiente para eliminar células vegetativas dos microrganismos presentes, enquanto as condições ácidas desses produtos impedem a germinação e crescimento dos esporos sobreviventes. Entretanto, espécies de *Clostridium* e outros microrganismos, incluindo os dos gêneros *Bacillus* e *Alicyclobacillus*, têm sido implicados na deterioração de produtos ácidos tratados termicamente. Recentemente, indústrias processadoras da região de Viçosa apresentaram problemas com a deterioração de polpa de manga comercialmente estéril pela ação de microrganismos anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos formadores de esporos.

Para a inativação de esporos termorresistentes é necessário tratamento térmico intenso, o que é indesejável devido às mudanças nas características nutricionais e sensoriais do produto. Estudos têm sugerido tecnologias alternativas de preservação de

alimentos, com o objetivo de substituir os métodos tradicionais de tratamento térmico, acidificação ou preservação química por tratamentos eficientes, porém menos drásticos. Essa tendência reflete o aumento da demanda por produtos alimentícios com as características naturais preservadas, mas com a segurança microbiológica garantida. Dentre as alternativas estudadas, o uso de microrganismos (biopreservação) ou de seus metabólitos, como, por exemplo, bacteriocinas, tem sido um dos tópicos de maior interesse.

O uso de bacteriocinas como preservativo de alimentos tem sido o alvo de muitos trabalhos científicos. Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico compreendem um amplo e diverso grupo de peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente. Possuem efeito bactericida ou bacteriostático, não são letais para as células que as produzem e têm ação, principalmente, contra bactérias Gram-positivas. Estes peptídeos têm aplicação na tecnologia de barreiras, podendo ser utilizados em combinação com outros tratamentos na preservação de alimentos.

Uma nova bacteriocina, a bovicina HC5, foi recentemente caracterizada e suas propriedades, como amplo espectro antimicrobiano, estabilidade ao calor e a baixos valores de pH, a confere potencial para ser utilizada na preservação de alimentos. O objetivo deste trabalho foi testar a atividade dessa bacteriocina sobre o crescimento de bactérias isoladas de polpa de manga deteriorada, avaliando seu efeito na resistência térmica e na germinação de esporos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Processamento e deterioração de polpas e sucos de frutas

2.1.1. Contaminação e processamento

De acordo com ROLLER (1999), a deterioração microbiana de alimentos representa enorme perda de recursos para a indústria alimentícia e, indiretamente, para o consumidor. MORAES e GOMES (2004) ressaltam que uma vez presentes no alimento, os microrganismos podem deteriorá-lo, tornando-o inaceitável para o consumo, o que acarretará em prejuízos econômicos e sociais, embora não necessariamente, em danos à saúde. A perda de alimentos por deterioração inicia-se na fazenda e continua durante a pós-colheita, distribuição, processamento, comercialização e o uso pelo consumidor (ROLLER, 1999).

Sucos e polpa de frutas são susceptíveis a contaminação microbiana, principalmente devido à contaminação da matéria prima, ou seja, a fruta. Isso se deve ao contato das frutas com o solo, insetos e animais durante seu crescimento e colheita no campo. Esporos de microrganismos das espécies de *Bacillus*, *Clostridium* e *Alicyclobacillus* estão presentes no solo e podem contaminar os frutos, materiais e os equipamentos utilizados no processamento desses frutos. Em geral, o produto fresco chega à indústria alimentícia com uma contagem total em sua superfície entre 10^4 e 10^6 UFC (unidades formadoras de colônias) por grama do produto (PAO e BROWN,

1998). Essa contagem pode ser ainda maior se os frutos não forem manipulados de maneira adequada. Além disso, a contaminação, localizada inicialmente na superfície, pode atingir a polpa pela presença de injúrias e ao manuseio inadequado dos frutos durante seu processamento.

Geralmente polpas e sucos de frutas apresentam pH inferior a 4,5 e, dessa maneira, o tratamento térmico na faixa de 85 °C a 95 °C aplicado na indústria alimentícia é suficiente para assegurar a qualidade microbiológica do produto (SILVA *et al.*, 1999). De acordo com AZIZI e RANGANNA (1993), o processamento da polpa de manga envolve acidificação da polpa para valores de pH igual ou inferior a 4,0 e aquecimento a 95 °C por 20 s. Esse tratamento elimina todos os microrganismos não formadores de esporos que são capazes de deteriorar o produto e, geralmente, os esporos sobreviventes não têm condições de germinar e crescer em razão do pH baixo (MURAKAMI *et al.*, 1998; SETLOW e JOHNSON, 2001).

Entretanto, mesmo nessas condições, têm sido relatados casos de deterioração de produtos ácidos (pH < 4,5) tratados termicamente (DE JONG, 1989; AZIZI e RANGANNA, 1993; YAMAZAKI *et al.*, 1996). Somente microrganismos termoacidófilos formadores de esporos seriam capazes de resistir ao tratamento térmico e crescer em condições de alta acidez (VIEIRA *et al.*, 2002). Muitos microrganismos com essas características passaram, então, a ser isolados de produtos ácidos tratados termicamente (DE JONG, 1989; AZIZI e RANGANNA, 1993; MCINTYRE *et al.*, 1995; YAMAZAKI *et al.*, 1996; VIEIRA *et al.*, 2002).

2.1.2. Microrganismos deterioradores de produtos tratados termicamente

Bactérias Gram-positivas formadoras de esporos têm sido reconhecidas como agentes deterioradores de vários produtos alimentícios tratados termicamente (MURAKAMI *et al.*, 1998). Microrganismos dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Alicyclobacillus* formam esporos termorresistentes, podendo germinar em produtos ácidos tratados termicamente, causando a deterioração. AZIZI e RANGANNA (1993) constataram que polpas e sucos de manga acidificados e tratados termicamente apresentaram crescimento de *Bacillus licheniformis*, uma bactéria anaeróbia

facultativa e formadora de esporos e de *Clostridium sporogenes*, um anaeróbio obrigatório e também formador de esporos.

Bacillus coagulans, *B. licheniformis* e *Clostridium butyricum* são reconhecidos como agentes de deterioração de conservas alimentícias ácidas (YAMAZAKI *et al.*, 2000; EVERIS e BETTIS, 2001). Recentemente, outra bactéria termoacidófila, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, foi isolada e relacionada como agente deteriorador de sucos ácidos (YAMAZAKI *et al.*, 1996; YAMAZAKI *et al.*, 2000). Esse microrganismo tem sido considerado um dos mais importantes para o controle de qualidade de alimentos ácidos tratados termicamente (YAMAZAKI *et al.*, 2000; SILVA e GIBBS, 2001). *A. acidoterrestris* é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica e formadora de esporos que, além de resistir ao tratamento de pasteurização normalmente aplicado em produtos à base de frutas, pode germinar e crescer causando a deterioração.

Outras espécies de *Bacillus* como *B. cereus* e *B. thuringiensis* também têm sido isolados de vários produtos alimentícios tratados termicamente (ROSENQUIST *et al.*, 2005). Estes microrganismos são comumente encontrados na natureza e, devido à resistência de seus esporos, podem sobreviver a diferentes condições de estresse durante o processamento do produto, como, por exemplo, o tratamento térmico (ROSENQUIST *et al.*, 2005). Ambas as espécies, além de contribuir para a deterioração do produto, produzem enterotoxinas que podem causar diarreia em humanos. Essas duas espécies são semelhantes taxonomicamente e são distinguidas fenotipicamente apenas pela presença de corpos de inclusão cristalina em *B. thuringiensis*. Além de produzir a toxina diarreica, *B. cereus* também produz a toxina emética. A síndrome diarreica é causada pela ingestão do microrganismo que, uma vez no intestino produz a toxina entérica. A toxina emética é produzida no alimento que, uma vez ingerido, irá causar os sintomas (ROSENQUIST *et al.*, 2005).

Apesar da característica patogênica de *B. thuringiensis*, sua presença em alimentos e o envolvimento em surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados não é bem caracterizada. Tal fato pode ser explicado pela dificuldade de distinguir entre *B. cereus* e *B. thuringiensis* e ROSENQUIST *et al.* (2005) afirmaram que algumas das doenças de origem alimentar atribuídas ao *B. cereus* podem ser

causadas por *B. thuringiensis*. Estes mesmos autores fizeram o isolamento destas duas espécies em alimentos e a maioria dos isolados foi identificada como *B. thuringiensis*, pela presença de corpos de inclusão cristalina.

A deterioração causada por *A. acidoterrestris* em produtos como sucos e polpa de frutas não está relacionada à produção de gás, por isso não é visivelmente detectada (VIEIRA *et al.*, 2002). Alguns compostos como guaiacol (PETTIPHER *et al.*, 1997) e halofenóis como o 2,6-dibromofenol e 2,6-diclorofenol (JENSEN e WHITFIELD, 2002) têm sido detectados em sucos de frutas deteriorados e relacionados com o crescimento desse microrganismo. A deterioração causada por espécies de *Clostridium* e *Bacillus* geralmente está relacionada à produção de compostos como ácidos ou H₂S, e, no caso de *Clostridium*, ainda é observada produção de gás (WILKES *et al.*, 2000). Esses produtos da atividade microbiana resultam na perda das propriedades sensoriais do produto.

A capacidade dessas bactérias de crescer em valores de pH abaixo de 4,5 e de seus esporos apresentarem elevada resistência térmica em bebidas ácidas, determina a necessidade de se desenvolverem estratégias para inativar ou controlar a germinação dos esporos e o crescimento das células vegetativas. Um tratamento térmico prolongado e mais drástico seria suficiente para inativar esses microrganismos. Entretanto, esta prática não é desejável, pois afeta as características sensoriais e nutricionais do produto (CERF *et al.*, 1996). O uso de conservantes químicos não é de fácil aceitação pelo consumidor, que está cada vez mais preocupado em consumir produtos naturais e com alto valor nutritivo (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004).

A demanda por alimentos industrializados que mantenham suas características naturais tem levado ao estudo de novos aditivos alimentares como, por exemplo, bacteriocinas. O uso de bacteriocinas, concomitantemente ao tratamento térmico, pode resultar na diminuição do tempo de inativação térmica ou inibição da germinação de esporos de microrganismos termorressistentes presentes, sem afetar as características naturais do produto. Vários estudos têm demonstrado a efetividade de bacteriocinas no controle de microrganismos formadores de esporos termorresistentes em sucos e polpa de frutas (KOMITOPOULOU *et al.*, 1999; SILVA, 2000; YAMAZAKI *et al.*, 2000; GRANDE *et al.*, 2005).

2.2. Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico

Bacteriocinas de bactérias do ácido láctico são as mais estudadas e as que apresentam melhor potencial para aplicação comercial. Uma ampla variedade destas substâncias antimicrobianas com potencial de utilização como conservante de alimentos tem sido caracterizada. A seguir estão descritas algumas das principais características dessas bacteriocinas.

2.2.1. Classificação

Bacteriocinas de bactérias lácticas podem ser divididas em duas classes, baseadas nas suas características comuns, principalmente as estruturais (HÉCHARD e SAHL, 2002; COTTER *et al.*; 2005; DEEGAN *et al.*, 2006). Bacteriocinas da classe I são de tamanho pequeno (< 5 kDa; 19 a 38 aminoácidos), contendo aminoácidos modificados pós-tradução tais como lantionina e metillantionina e são denominadas lantibióticos, sendo a nisina a principal representante desta classe (NES *et al.*, 1996; DIRIX *et al.*, 2004; COTTER *et al.*, 2005).

A classe II compreende bacteriocinas com peso molecular abaixo de 10 kDa (37 a 48 aminoácidos), hidrofóbicas, termoestáveis e que não contêm lantionina. Dentro dessa classe podem ser definidas três subclasses: IIa, IIb e IIc. A subclasse IIa compreende peptídeos que possuem atividade contra *Listeria*, possuindo uma seqüência N-terminal comum, sendo pediocina PA-1 e curvacina A alguns exemplos típicos. A classe IIb constitui-se de bacteriocinas que requerem atividade complementar de dois peptídeos para a atividade bacteriocinogênica, ou pelo menos, para a atividade ótima, sendo alguns exemplos: lactococina G, lactococina M e lactacina F. A classe IIc compreende peptídeos ativados por tiol, que requerem resíduos de cisteína reduzida para tornarem-se ativos, tal como observado para lactacina B. As seqüências N- e C-terminal destas bacteriocinas são covalentemente ligadas, resultando em uma estrutura cíclica (NES *et al.*, 1996; CLEVELAND *et al.*, 2001; DIRIX *et al.*, 2004; COTTER *et al.*, 2005).

Alguns autores ainda consideram a existência das classes III e IV (NES *et al.*, 1996; CAPLICE e FITZGERALD, 1999; DIRIX *et al.*, 2004). A classe III de bacteriocinas parece ser constituída de proteínas grandes, com peso molecular acima de 30 kDa e sensíveis ao calor. Pouca informação a respeito dessas bacteriocinas está disponível na literatura. Alguns exemplos dessa classe seriam a helveticina J, helveticina V-1829, acidofilina e lactacina A (MONTVILLE e CHEN, 1998; MOLL *et al.*, 1999). É sugerido que a quarta classe é constituída por bacteriocinas que formam grandes complexos com uma mistura indefinida de proteínas, lipídeos e carboidratos que são requeridos para sua atividade. Esta classe também é pouco entendida e como exemplo pode-se citar plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 e pediocina SJ1 (NES *et al.*, 1996; MONTVILLE e CHEN, 1998; DIRIX *et al.*, 2004).

COTTER *et al.* (2005) consideraram que as bacteriocinas da classe III são, na verdade, bacteriolisinas (proteínas líticas). Seu mecanismo de ação é distinto do mecanismo de ação de bacteriocinas, já que promovem a lise de células sensíveis catalisando a hidrólise da parede celular (COTTER *et al.*, 2005). Diferente de bacteriocinas, bacteriolisinas nem sempre apresentam genes específicos de imunidade que acompanham o gene estrutural da bacteriocina (COTTER *et al.*, 2005). Esses autores não consideram a existência da classe IV, já que nenhuma bacteriocina desta classe foi convincentemente demonstrada.

2.2.2. Síntese e transporte

A síntese de bacteriocinas ocorre geralmente ao final da fase log de crescimento e início da fase estacionária, podendo funcionar como uma estratégia competitiva das células produtoras (MOLL *et al.*, 1999; HÉCHARD e SAHL, 2002; DEEGAN *et al.*, 2006). A regulação da produção pode ser mediada por um sistema de transdução de sinal de dois componentes, como parte de um mecanismo de *quorum sensing* (COTTER *et al.*, 2005). Os genes para a produção de bacteriocinas estão geralmente localizados em operons, que podem estar presentes no cromossomo da célula ou serem codificados por um plasmídeo ou transposon (ENGELKE *et al.*, 1992; ALTENA *et al.*,

2000; COTTER *et al.*, 2005). Muitos desses operons caracterizados codificam bacteriocinas que pertencem à classe I (CLEVELAND *et al.*, 2001).

Tipicamente, bactérias com atividade bacteriocinogênica possuem genes que codificam a bacteriocina (peptídeo estrutural), proteínas que auxiliam no processamento da forma ativa, proteínas responsáveis pelo transporte da bacteriocina através da membrana, proteínas regulatórias e proteínas que conferem imunidade à célula produtora (MCAULIFFE *et al.*, 2001; CLEVELAND *et al.*, 2001; COTTER *et al.*, 2005). Enquanto todas as classes de bacteriocinas são sintetizadas ribossomicamente, somente a classe I possui aminoácidos modificados pós-traducionalmente para produzir a forma ativa do peptídeo (CLEVELAND *et al.*, 2001; COTTER *et al.*, 2005).

Juntamente com a bacteriocina, são sintetizadas também as proteínas relacionadas ao sistema regulatório de três componentes: HPK (histidina cinase); IF (fator de indução) e RR (regulador de resposta). O IF é requerido como um sinal para a indução da transcrição dos genes alvo. Assim como a bacteriocina, também é sintetizado na forma de pré-peptídeo e é transportado e processado na forma ativa. Em alguns casos, o fator de indução pode ser a própria bacteriocina (ENNAHAR *et al.*, 2000; MCAULIFFE *et al.*, 2001; COTTER *et al.*, 2005).

As moléculas indutoras ligam-se a HPK que ativa o regulador de resposta, por fosforilação. Esse regulador vai então atuar na ativação dos genes responsáveis pela síntese da bacteriocina. A pré-bacteriocina, juntamente com a proteína de imunidade são sintetizadas e a bacteriocina é processada e exportada para fora da célula através do sistema de transporte ABC (*ATP-binding cassette*). Operons de muitas bacteriocinas da classe II possuem genes que codificam a síntese de proteínas homólogas ao transportador ABC, bem como suas proteínas acessórias, que são requeridas para a exportação da bacteriocina através da membrana celular (ENNAHAR *et al.*, 2000).

A maioria das bacteriocinas da classe I e II é transportada para fora da célula por um sistema de transporte ABC. A única exceção são algumas bacteriocinas da classe II que são transportadas através de um sistema sec dependente (ENNAHAR *et al.*, 2000; COTTER *et al.*, 2005). Essas bacteriocinas são secretadas por uma única forma de transportador ABC, que possui uma seqüência N-terminal de,

aproximadamente, 150 aminoácidos e exerce atividade proteolítica específica que cliva a seqüência líder da bacteriocina. Concomitantemente com a secreção, ocorre a clivagem e, assim, a ativação da bacteriocina. Uma proteína acessória é necessária para esse processo de secreção. Os transportadores ABC que secretam lantibióticos com diferentes seqüências líder não possuem atividade proteolítica N-terminal, e a remoção da seqüência líder da bacteriocina é feita por protease codificada juntamente com a bacteriocina. Um exemplo desse tipo de protease seria a enzima NisP no sistema de secreção da nisina (ENNAHAR *et al.*, 2000; CLEVELAND *et al.*, 2001; COTTER *et al.*, 2005).

2.2.3. Mecanismo de ação

De maneira geral, o mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I e II envolve, inicialmente, a ligação da bacteriocina aos receptores específicos ou não específicos na membrana celular da bactéria alvo. Neste estágio, bacteriocinas são sensíveis a uma possível ação de enzimas proteolíticas. Em seguida, ocorre a inserção da bacteriocina na membrana causando a dissipação da força próton-motora e a agregação de monômeros resultando na formação de poros, por onde a célula perde material intracelular, o que pode acarretar na perda de viabilidade da célula alvo (MONTVILLE e CHEN, 1998; ENNAHAR *et al.*, 2000).

A nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina que tem sido mais estudada e cujo modo de ação é melhor entendido (RUSSELL e MANTOVANI, 2002). Consiste de um pequeno polipeptídeo com 34 aminoácidos e possui *status* GRAS – *Generally recognized as safe*, tendo sido aprovada nos Estados Unidos em 1988 pela FDA – *Food and Drug Administration* - como preservativo de alimentos, sendo uma das bacteriocinas disponível comercialmente, juntamente com a pediocina PA1 (MONTVILLE e CHEN, 1998; CLEVELAND *et al.*, 2001; DEEGAN *et al.*, 2006). A nisina possui efeito antibacteriano sobre várias bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, esporos de *Clostridium* e *Bacillus* e algumas bactérias Gram-negativas (CLEVELAND *et al.*, 2001).

O alvo primário da nisina envolve a interação com precursores do peptidoglicano e formação de poros na membrana citoplasmática do microrganismo sensível, com perda do potencial de membrana e extravasamento de material intracelular como aminoácidos, potássio, fosfato inorgânico e ATP intracelular (MONTVILLE e CHEN, 1998; ENNAHAR *et al.*, 2000; HELANDER *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a nisina interage com o lipídeo II, que é um precursor da parede celular, que parece facilitar sua inserção na membrana, agindo como uma âncora na membrana celular para a nisina (BREUKINK *et al.*, 1999).

Bacteriocinas pertencentes à classe II, especificamente da subclasse IIa, tendem a dissipar a força próton motora (FPM) via dissipação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e, ou o gradiente químico (ΔpH). A FPM (Δp) conduz a síntese de ATP e o acúmulo de íons e outros metabólitos. Bacteriocinas promovem o colapso da FPM o que leva a célula à morte devido a parada das reações de síntese de energia (MCAULIFFE *et al.*, 2001). Em *Listeria monocytogenes* e em *Enterococcus faecalis* foi demonstrado que essas bacteriocinas primeiro interagem com a molécula alvo, possivelmente a permease do sistema PTS de manose (DALET *et al.*, 2001; HÉCHARD *et al.*, 2001). Esta interação é necessária para atividade, provavelmente favorecendo a ligação da bacteriocina com a membrana citoplasmática. A possível interação da bacteriocina com a manose permease poderia também resultar na abertura desta permease e, portanto, permeabilizar a célula alvo. Depois, a bacteriocina pode interagir com a membrana citoplasmática levando tanto à formação de poros ou à dissipação do Δp . Este segundo passo pode não requer uma molécula alvo e pode ser mais dependente de interações eletrostáticas e, ou hidrofóbicas (HÉCHARD e SAHL, 2002).

Vários fatores influenciam na atividade da bacteriocina sobre a célula, incluindo a estrutura e a quantidade de bacteriocina, a composição e o Δp , a estrutura e o nível de expressão da proteína de imunidade e a composição química do meio. Uma das descobertas recentes mais importante é que a subclasse IIa de bacteriocinas precisa de uma molécula alvo na superfície das células sensíveis para ser ativa (ENNAHAR *et al.*, 2000; HÉCHARD e SAHL, 2002).

2.2.4. Imunidade das células produtoras de bacteriocinas

A imunidade das células produtoras de bacteriocinas ocorre devido a proteínas de imunidade. Estas proteínas protegem a célula produtora contra a ação de sua bacteriocina, uma vez que o gene que codifica a proteína de imunidade é transcrito juntamente com a bacteriocina (HÉCHARD e SAHL, 2002). Como já mencionado, os genes relacionados às bacteriocinas são organizados em operons, possuindo funções na imunidade, processamento, transporte e regulação, bem como nas modificações pós-traducionais em lantibióticos. Em geral, o primeiro gene do operon é o gene estrutural da bacteriocina, sendo acompanhado pelo gene de imunidade. Geralmente, a imunidade é conferida por uma única proteína com seqüência pouco conservada entre diferentes tipos de bactérias. As proteínas de imunidade parecem estar associadas com a membrana citoplasmática de bactérias produtoras de bacteriocina (YARMUS, 2000).

Em alguns lantibióticos, vários genes estão envolvidos na imunidade: um transportador ABC composto de duas proteínas no caso da subtilina, epidermina e lactinina e uma lipoproteína adicional no sistema da nisina e subtilina (YARMUS, 2000). No caso de *L. lactis* produtor da nisina, a imunidade é conferida pelas proteínas NisI, E, F e G. NisI é uma lipoproteína que liga-se à nisina na superfície externa da membrana celular e previne sua inserção. As funções das demais proteínas não são bem entendidas, mas parecem ser transportadores ABC que expulsam a nisina da célula ou promovem sua degradação (RUSSELL e MANTOVANI, 2002).

Além de conferir imunidade aos produtores de bacteriocina, essas proteínas parecem proteger as células parcialmente contra outras bacteriocinas da classe II. Isto sugere a princípio, uma conexão entre duas noções distintas de resistência e imunidade de bacteriocinas. A existência de imunidade cruzada entre a classe IIa de bacteriocina é suportada pela presença de cópias de genes de imunidade em bactérias lácticas produtoras de bacteriocina da classe IIa, não necessariamente associada com um gene que codifica uma bacteriocina cognata. Isto pode sugerir que determinado gênero de bactéria láctica, o qual contém produtores de bacteriocina da classe IIa, geralmente possui um ou mais genes de imunidade para a classe IIa (ENNAHAR *et al.*, 2000).

2.2.5. Mecanismos de resistência

Bactérias previamente sensíveis a bacteriocinas podem se tornar resistentes à ação das mesmas pelo desenvolvimento de mecanismos de defesa (MANTOVANI, 2002). Pelo menos três mecanismos de resistência têm sido descritos: produção de enzimas que inativam a bacteriocina; mudanças na composição lipídica da membrana; e mudança na composição da parede celular (MAZZOTTA e MONTVILLE, 1997; CRANDALL e MONTVILLE, 1998). Dessa maneira, resistência a bacteriocinas é um fenótipo complexo e pode ser o resultado cumulativo de várias mudanças fenotípicas (CRANDALL e MONTVILLE, 1998).

MAZZOTTA e MONTVILLE (1997) observaram que linhagens resistentes de *L. monocytogenes* possuíam conteúdo de ácidos graxos diferente da linhagem selvagem. Esses mesmos autores em 1999 verificaram que linhagens mutantes de *C. botulinum* resistentes à nisina também possuíam conteúdo de ácidos graxos diferente da linhagem selvagem. Este mutante apresentava elevado conteúdo de ácidos graxos saturados, o que confere maior rigidez à membrana plasmática (MAZZOTTA e MONTVILLE, 1999). CRANDALL e MONTVILLE (1998) mostraram que resistência à nisina em *L. monocytogenes* está associada não somente à modificação do conteúdo de ácidos graxos, mas também, a alterações na composição de fosfolipídios e da parede celular e à presença de cátions divalentes. Esses autores afirmaram que, segundo Abee *et al.* (1994), a presença desses cátions parece inibir a interação eletrostática entre as cargas positivas da nisina e as cargas negativas dos fosfolipídios. A neutralização das cargas negativas dos grupos fosfolipídios pode ainda induzir a condensação desses fosfolipídios, resultando em uma membrana mais rígida (CRANDALL e MONTVILLE, 1998).

2.2.6. Utilização de bacteriocinas em alimentos

Bacteriocinas de bactérias lácticas têm potencial de serem utilizadas como conservante em alimentos como carnes, produtos lácteos, alimentos enlatados, peixes, bebidas alcoólicas, vegetais fermentados, entre outros. Este uso pode ser em combinação com outros tratamentos pelo uso da bacteriocina como aditivo alimentar

ou pela incorporação da bacteriocina nas embalagens do produto (COTTER *et al.*, 2005).

A preferência pelo estudo de bacteriocinas produzidas por LAB ocorre pelo fato delas superarem algumas das situações adversas que podem afetar a efetividade de algumas bacteriocinas em sistemas de produção e processamento de alimento (RODRÍQUEZ *et al.*, 2003). Bacteriocinas de bactérias lácticas são geralmente estáveis ao calor, hidrofóbicas e degradadas pela ação de enzimas proteolíticas do trato intestinal humano. Estas características conferem a estas bacteriocinas interesse especial, devido ao seu potencial biopreservativo em alimentos, podendo atuar no aumento da vida de prateleira dos produtos, suprimindo a adição de conservantes químicos que podem ser prejudiciais à saúde (SHILLINGER *et al.*, 1996; ONDA *et al.*, 2003).

As estratégias para incorporar bacteriocinas em alimentos incluem a inoculação de bactérias lácticas como culturas *starter* que produzam a bacteriocina *in situ* e a adição de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas como conservante (DE PAULA, 2000). A produção de bacteriocina *in situ* por culturas *starter* tem aplicação em alimentos fermentados. Em produtos refrigerados e não fermentados, tais como carne e vegetais minimamente processados, somente aquelas estirpes que produzem bacteriocinas potentes em quantidades suficientes podem ser aplicadas. Outros metabólicos, se produzidos em grandes quantidades, são prejudiciais para a qualidade sensorial do produto (SCHILLINGER *et al.*, 1996).

A nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades Internacionais/kg de peso corpóreo (CLEVELAND *et al.*, 2001). Esta bacteriocina possui *status GRAS* e foi aprovada para uso nos EUA em queijo pasteurizado, como um agente anti-botulínico, como também em ingredientes líquidos de ovo pasteurizado. Em outros países, a nisina é utilizada em uma escala maior como um agente antimicrobiano em alimentos (SIRAGUSA *et al.*, 1999).

Diversos países permitem o uso de nisina em produtos processados pasteurizados como leite, queijo, sopa de tomate e frutas, vegetais e carne enlatados,

peixes, maionese e alimentos infantis. Esta bacteriocina tem sido utilizada para preservar o sabor dos alimentos e para prevenir a fermentação do vinho após a fermentação alcoólica desejada ser obtida (CARR *et al.*, 2002; CLEVELAND *et al.*, 2001). No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo obedecendo o limite máximo de 12,5 mg/kg de alimento. Esse país é pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos cárneos, sendo permitida a sua aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos (SIRAGUSA *et al.*, 1999).

O fato da nisina demonstrar inefetividade em algumas situações e o surgimento de células resistentes entre populações sensíveis, tem levado ao estudo de novas bacteriocinas com potencial aplicação na preservação de alimentos.

2.3. Bovicina HC5

Estudos recentes indicaram que espécies de *Streptococcus* isoladas do rúmen bovino produzem bacteriocinas (MANTOVANI e RUSSELL, 2001) que possuem atividade de inibição contra espécies de *Clostridium*, *L. monocytogenes* e outras bactérias Gram-positivas (MANTOVANI e RUSSELL, 2003). Dois tipos de bacteriocinas, bovicina 255 (WHITFORD *et al.*, 2001) e bovicina HC5 (MANTOVANI *et al.*, 2002) foram identificadas. Bovicina HC5, isolada de *S. bovis* HC5, mostrou ter amplo espectro antibacteriano em relação à bovicina 255 (MANTOVANI e RUSSELL, 2001; MANTOVANI *et al.*, 2002).

S. bovis HC5 é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa que possui requerimentos nutricionais simples e tempo de geração curto. Bovicina HC5 possui amplo espectro de ação, sendo mais ativa em valores de pH inferiores a 5,5 (LEE *et al.*, 2002). A maior parte da bacteriocina produzida fica associada às células, podendo ser liberada por tratamento ácido (HOULIHAN *et al.*, 2004). Seu peso molecular é de aproximadamente 2440 Da e sua seqüência amino-terminal lhe é peculiar: VGXRYASXPGXSWKYVXF. Quatro resíduos não foram identificados, o que sugere que a bovicina HC5 possui aminoácidos modificados pós-traducionalmente. Essa característica lhe confere similaridade aos lantibióticos.

Essa bacteriocina é resistente à alfa-quimiotripsina, à proteinase K e ao calor (121 °C por 20 min), propriedades vantajosas para sua aplicação comercial. Possui estabilidade ao oxigênio, o que facilita sua manipulação e utilização. Estudos demonstraram que sua atividade bacteriocinogênica é mediada pela formação de poros na membrana plasmática, dissipando os gradientes químico e elétrico que formam a força próton-motora da célula alvo (MANTOVANI *et al.*, 2002; HOULIHAN *et al.*, 2004).

A atividade inibitória da bovicina HC5 foi demonstrada em microrganismos como *Clostridium aminophilum* (MANTOVANI e RUSSELL, 2002), *C. sporogenes* (FLYTHER e RUSSELL, 2004) e *L. monocytogenes* (MANTOVANI e RUSSELL, 2003) e a adaptação destes microrganismos a esta bacteriocina não foi observada. O efeito da bovicina HC5 sobre o *C. botulinum* ainda não foi verificado, mas pelo fato de *C. sporogenes* e *C. botulinum* tipo A e B possuírem propriedades fisiológicas similares, a bovicina HC5 pode ter o mesmo efeito contra *C. botulinum* (FLYTHER e RUSSELL, 2004).

Estudos testando a efetividade da bovicina HC5 em alimentos ainda não foram realizados. Por suas características, esta bacteriocina tem potencial para ser utilizada na preservação de alimentos. De acordo com MANTOVANI e RUSSELL (2003), a bovicina HC5 pode ser mais potente e útil que a nisina. As propriedades deste peptídeo fazem dele um candidato potencial para inibir bactérias deterioradoras esporuladas em produtos ácidos, como polpa de frutas, podendo ser usada, concomitantemente, ao tratamento térmico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Preparo da polpa de manga

Neste trabalho utilizou-se polpa de manga industrializada adquirida em supermercado local. Para a realização dos experimentos, a polpa foi diluída com água destilada na proporção 1:2, conforme recomendação do fabricante para preparo de suco. O pH da polpa de manga era 4,3 e, segundo informação nutricional descrita pelo fabricante, cada 100 g da polpa continha: 200 µg de vitamina A; 51 µg de vitamina B1; 56 µg vitamina B2; 43 mg de vitamina C; 0,5 mg de niacina; 0,4 g de glicídios; 0,4 g de proteínas; 0,3 g de lipídeos; 2 mg de cálcio; 17 mg de fósforo e 0,8 mg de ferro.

3.2. Microrganismos e condições de cultivo e estocagem

A relação dos microrganismos utilizados neste estudo encontra-se descrita na Tabela 1. *Streptococcus bovis* HC5 foi cultivado em condições de anaerobiose a 39 °C, em meio basal contendo, por litro: 4 g de glicose, 292 mg de K₂HPO₄, 292 mg de KH₂PO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄.7H₂O, 64 mg de

CaCl₂.2H₂O, 500 mg de cisteína, 1 g de tripticase, 4 g de Na₂CO₃ e 0,5 g de extrato de levedura, conforme descrito por MANTOVANI e RUSSELL (2001).

As bactérias anaeróbias facultativas e estritas foram previamente isoladas da polpa de manga deteriorada por COSTA (2006). Os isolados anaeróbios estritos foram identificados como *Clostridium tyrobutyricum* (COSTA, 2006). Esses microrganismos foram cultivados em meio infusão de cérebro e coração - BHI (Acumedia[®]) e incubados a 30 °C. O meio BHI foi acrescido de cisteína (500 mg/L) e solução de resazurina (1 mL/L) para o cultivo de microrganismos anaeróbios estritos. Nesse caso, os meios de cultura foram preparados anaerobiamente, sob atmosfera de CO₂, distribuídos em garrafas anaeróbias e selados com rolhas de borracha. Os isolados anaeróbios facultativos foram cultivados em condições de aerobiose e os anaeróbios estritos em condições anóxicas.

O microrganismo indicador *L. lactis* ATCC 19435 foi cultivado a 30 °C em meio MRS (DE MAN *et al.*, 1960), contendo por litro: 10 g de proteose peptona; 10 g de extrato de carne; 5 g de extrato de levedura; 1 g de Tween 80; 2 g de citrato de triamônio; 0,205 g de MgSO₄; 0,056 g de MnSO₄; 2,62 g de K₂HPO₄; 20 g de sacarose; e 5 g de acetato de sódio. A linhagem de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSMZ 2498, utilizada como cultura de referência, foi cultivada em meio AAM – meio para *A. acidoterrestris* (YAMAZAKI *et al.*, 2000), contendo por litro: 1 g de extrato de levedura; 0,2 g de (NH₄)₂SO₄; 0,5 g de MgSO₄.7H₂O; 0,25 g de CaCl₂.2H₂O; 0,6 g de KH₂PO₄; 1 g de glicose e 1 L de água destilada. O pH do meio foi ajustado para 4,0 e a cultura foi incubada aerobiamente a 40 °C.

As culturas foram submetidas à coloração de Gram e à análise microscópica para avaliação do seu grau de pureza. Culturas puras dos isolados foram mantidas congeladas a -20 °C no meio de crescimento com 20 % de glicerol. No início de cada experimento, cada cultura foi estriada no mesmo meio de crescimento acrescido de ágar na concentração de 1,5 % e, posteriormente, ativadas em meio líquido por 12 h.

Tabela 1. Relação de microrganismos Gram-positivos utilizados neste estudo

Microrganismo	Características	Isolado de	Origem
<i>Streptococcus bovis</i> HC5	Cocos, anaeróbio Facultativo	Rúmen bovino	James B. Russell
Isolado LMA09	Bastonete, anaeróbio facultativo, formador de esporos	Polpa de manga	LMA*
Isolado LMA19	Bastonete, anaeróbio facultativo, formador de esporos	Polpa de manga	LMA*
Isolado LMA65	Bastonete, anaeróbio facultativo, formador de esporos	Polpa de manga	LMA*
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA45	Bastonete, anaeróbio estrito, formador de esporos	Polpa de manga	LMA*
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA63	Bastonete, anaeróbio estrito, formador de esporos	Polpa de manga	LMA*
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA72	Bastonete, anaeróbio estrito, formador de esporos	Polpa de manga	LMA*
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	Cocos, não formador de Esporos	—	ATCC**
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSMZ 2498	Bastonete, aeróbio, formador de esporos	Suco de maçã	DSMZ***

* LMA = Laboratório de Microbiologia de Alimentos/ Departamento de Microbiologia - UFV

**ATCC = American Type Culture Collection

***DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

3.3. Obtenção de endosporos bacterianos

Para a produção de esporos, os isolados anaeróbios facultativos foram ativados em caldo nutriente contendo por litro: 1 g de extrato de carne; 2 g de extrato de levedura; 5 g de peptona; e 5 g de NaCl (COLLADO *et al.*, 2005). O caldo nutriente foi acrescido de MnSO₄ na concentração de 3 mg/L. Os isolados foram incubados a 30 °C em agitação (150 rpm) por cinco dias e, posteriormente, a 4 °C por três dias para atingir alto grau de esporulação (AZEREDO *et al.*, 2002).

Foram preparadas lâminas com coloração simples para verificar a presença de esporos e as culturas foram centrifugadas a 1742 g por 10 min, a 5 °C (Sorvall® RT 6000 D) e o sobrenadante descartado. O material centrifugado foi ressuspensão em 20 mL de solução salina (0,85 %). A suspensão de esporos foi mantida em banho-maria a 70 °C, por 20 min, para inativação das células vegetativas e ativação dos esporos. Após este tratamento, a suspensão de esporos foi centrifugada por três vezes consecutivas (1742 g, 10 min, 5 °C) e o sobrenadante descartado. Os esporos foram ressuspensionados em 10 mL de solução salina (0,85 %) e quantificados por contagem de colônias em meio BHI, acrescido de 1,5 % de ágar. A suspensão de esporos foi armazenada a 4 °C.

Esporos de *A. acidoterrestris* foram obtidos seguindo a metodologia descrita por SILVA *et al.* (1999), utilizando o mesmo meio de cultivo descrito no item 3.2.1. A cultura foi incubada a 40 °C por cinco dias. Após obtenção de esporos, foi seguida a mesma metodologia descrita para os isolados da polpa de manga para o preparo e armazenamento da suspensão de esporos.

3.4. Caracterização dos isolados anaeróbios facultativos deterioradores de polpa de manga

A identificação dos três isolados anaeróbios facultativos foi realizada previamente pela análise do perfil de ácidos graxos de membrana (Sherlock Microbial Identification System, Newark, DE, EUA). O resultado obtido indicou que os três microrganismos pertenciam às espécies *Bacillus cereus* ou *B. thuringiensis*. Para

distinção entre as espécies identificadas pela análise de ácidos graxos, testes bioquímicos e morfológicos complementares, baseados nas características descritas por HOLT *et al.* (1994) para *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*, foram feitos. Foram realizados testes bioquímicos para verificar a atividade hemolítica, a capacidade de redução de nitrato, a decomposição de tirosina e verificação de motilidade e presença de corpos de inclusão cristalina (BENNETT e BELAY, 2001).

Para verificar a capacidade hemolítica dos isolados, foi utilizado ágar sangue de carneiro, que foi preparado pela adição de 5 % (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado ao ágar base Columbia (Oxoid) fundido. Culturas puras dos isolados foram semeadas no ágar sangue e incubadas a 30 °C por 24 h. A presença de zonas claras ao redor das colônias indica a presença de beta-hemólise, resultado positivo do teste.

A capacidade de redução de nitrato e de motilidade foram avaliadas utilizando ágar motilidade nitrato, contendo por litro: 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 1 g de KNO₃, 2,5 g de Na₂HPO₄, 3 g de ágar, 5 g de galactose (C₆H₁₂O₆) e 5 mL de glicerina. Os componentes foram suspensos em água destilada e o meio foi fervido para dissolução completa dos reagentes e, em seguida foi distribuído em tubos de ensaio. Após autoclavagem a 121 °C por 15 min, o meio foi solidificado em posição vertical. As culturas foram semeadas em picada utilizando alça de repicagem em agulha. Os tubos foram incubados a 30 °C e depois de 24 h de incubação observou-se a ocorrência ou não de motilidade e foram acrescentados 0,5 mL dos reagentes alfa-naftilamina (solução 0,5 % de alfa-naftilamina em ácido acético 5 N) e ácido sulfanílico (solução 0,8 % de ácido sulfanílico em 125 mL de ácido acético 5 N) para verificar o resultado da redução de nitrato. Coloração rosa ou vermelha indica resultado positivo.

Para o teste de decomposição da tirosina, foi preparado ágar tirosina, contendo por litro: 1) Agar Base - 3 g de extrato de carne, 1 g de peptona e 15 g de ágar; 2) Solução de tirosina – L- tirosina (C₉H₁₁NO₃) 0,5 g, 10 mL de água destilada. Os dois componentes foram autoclavados separadamente. A 100 mL do meio base, fundido e resfriado a 48 °C, foram adicionados 10 mL de solução aquosa de tirosina a 5 %. Foram distribuídos 3,5 mL do meio por tubo de ensaio estéril, que foram inclinados e

resfriados rapidamente para evitar a separação da tirosina. As culturas foram semeadas na superfície do ágar inclinado utilizando alça de repicagem e os tubos foram incubados a 35 °C por 48 h. A presença de zonas claras próximas ao crescimento indica resultado positivo do teste.

Para verificar a presença de corpos de inclusão cristalina, a partir da suspensão de esporos obtida, como descrito no item 3.3, foi preparado um esfregaço que, depois de secar, foi fixado pelo calor. O esfregaço foi corado por 3 min com o corante constituído por: 0,25 g de azul coomassie; 50 mL de metanol (CH₃OH); 7 mL de ácido acético glacial (C₂H₂O₂) e 100 mL de água destilada. Em seguida, a lâmina foi lavada em água corrente e a presença de cristais tetragonais de toxina foi examinada utilizando microscópio óptico com aumento de 2000 X.

3.5. Preparo e determinação da atividade de bovicina HC5

Culturas de *S. bovis* HC5 em fase estacionária (1 L) tiveram o pH ajustado para 7,0 com NaOH na concentração de 1 mol/L e foram aquecidas a 70 °C por 30 min para inativar células e peptidases localizadas na membrana. As células foram centrifugadas (1742 g, 15 min, 5 °C) e o sobrenadante descartado. O material centrifugado foi lavado com 50 mL de tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 6,7) e tratado por 2 h em agitador magnético (temperatura ambiente) com mesmo volume de cloreto de sódio (100 mM), com pH ajustado para 2,0 utilizando HCl (1 mol/L). Depois do tratamento ácido, a suspensão celular foi centrifugada (1742 g, 15 min, 5 °C), o centrifugado descartado e o sobrenadante liofilizado e ressuspensão em 10 mL de tampão fosfato com pH ajustado para 2,0 utilizando HCl na concentração de 1 mol/L (MANTOVANI *et al.*, 2002).

O extrato obtido foi analisado quanto à atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar descrito por TAGG *et al.* (1976). A atividade da preparação foi quantificada pelo método de diluição crítica descrito por HOOVER e HARLANDER (1993), onde diluições seriadas do extrato (incrementos de duas vezes) foram feitas em tampão fosfato de sódio com pH ajustado para 2,0, e 25 µL de cada diluição foi aplicado em orifícios de 5 mm de diâmetro feitos em ágar contendo inóculo de,

aproximadamente, 10^6 UFC do microrganismo indicador *L. lactis* ATCC 19435. Tampão fosfato (pH 2,0), utilizado para resuspensão do extrato liofilizado e para as diluições, foi utilizado como controle. A atividade da bovicina HC5 expressa em unidades arbitrárias - UA/mL, foi calculada a partir do recíproco da maior diluição que ainda mostrou zona de inibição visível, considerando um halo mínimo de 5 mm, descontando o diâmetro do orifício.

3.6. Preparo e determinação da atividade da nisina

A solução de nisina (Chrisin C; CHL Hansen; 1000 UI/mg) foi preparada diluindo 1 g em 10 mL de tampão fosfato de sódio com pH ajustado para 2,0 utilizando HCl na concentração de 1 mol/L. A solução foi centrifugada (1742 g por 10 min) e o centrifugado descartado. A atividade da bacteriocina foi determinada pelo mesmo método descrito para a bovicina HC5 no item 3.5, utilizando *L. lactis* ATCC 19435 como microrganismo indicador.

3.7. Determinação da estabilidade de bovicina HC5 no sobrenadante dos isolados da polpa de manga deteriorada

A bovicina HC5 foi testada quanto à susceptibilidade ao sobrenadante da cultura dos isolados LMA09, LMA19, LMA65 e de *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63, e LMA72. Culturas em fase estacionária foram centrifugadas (1742 g, 15 min, 5 °C), o centrifugado descartado e 100 µL da bovicina HC5 foi misturado com volume igual do sobrenadante de cada isolado. O teste foi realizado utilizando, como controles, a tripsina e a proteinase K (Sigma) na concentração de 5 mg/mL, além da polpa de manga e caldo BHI, os quais foram misturados ao extrato da bacteriocina no mesmo volume que o sobrenadante dos isolados.

Todos os tratamentos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 3 h. A estabilidade da bovicina HC5 foi avaliada pelo método de difusão em meio sólido descrito no item 3.5, utilizando *L. lactis* ATCC 19435 como microrganismo indicador. Para descartar o possível efeito inibidor do sobrenadante dos isolados contra o

microrganismo indicador, o sobrenadante não acrescido de bacteriocina também foi adicionado aos orifícios feitos em meio sólido inoculado com o *L. lactis* ATCC 19435.

3.8. Efeito de bovicina HC5 sobre células vegetativas dos isolados da polpa de manga em caldo BHI

Células vegetativas dos isolados LMA09, LMA19, LMA65 e de *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63 e LMA72 foram inoculadas em caldo BHI acrescido de 0, 40, 80 e 160 UA/mL do extrato de bovicina HC5. O crescimento foi monitorado pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm (Spectronic 20D⁺) durante incubação a 30 °C. Foi determinada a velocidade específica de crescimento ($\mu - h^{-1}$), a duração da fase lag e a densidade óptica máxima (DO_{600nm}) atingida pelas culturas na presença das diferentes concentrações de bovicina HC5. Os isolados anaeróbios estritos foram inoculados em tubos (18 mm x 150 mm) selados com rolha de borracha, lacrados e inoculados utilizando seringas. O experimento foi realizado em três repetições e em duplicata e a nisina foi usada como referência nas mesmas concentrações da bovicina HC5. Os resultados obtidos representaram a média das repetições.

3.9. Efeito do pH sobre a atividade de bovicina HC5 contra células vegetativas inoculadas em polpa de manga diluída

O pH da polpa de manga diluída foi ajustado para 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 utilizando HCl ou NaOH na concentração de 1 mol/L. Volumes de 5 mL de polpa de manga diluída foram inoculados com 10⁶ UFC/mL dos isolados LMA09, LMA19, LMA65 e de *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63, e LMA72. Foi feita adição de 100 UA/mL de bovicina HC5 ou nisina. Os tubos foram incubados a 30 °C sob agitação de 150 rpm e nos tempos 0, 12 e 24 h de incubação, alíquotas de 100 μ L foram retiradas e submetidas a diluições seriadas sucessivas de 10⁻¹ a 10⁻⁷. O plaqueamento das diluições foi realizado em triplicata, utilizando a técnica de microgotas (MORTON, 2001), onde 20 μ L da diluição foram depositados em meio BHI acrescido de 1,5 % de

ágar. Amostras dos cultivos na presença das bacteriocinas foram plaqueados sem diluição a partir de 12 h de incubação. Tratamento controle sem adição de bacteriocina também foi utilizado.

A polpa de manga usada para o cultivo dos isolados anaeróbios estritos foi preparada anaerobiamente, sob atmosfera de CO₂, distribuída em garrafas anaeróbias e selada com rolhas de borracha. Os resultados obtidos representam a média da triplicata.

3.10. Efeito de bovicina HC5 sobre a produção de gás pelos isolados anaeróbios estritos

Para verificar o efeito da bovicina HC5 na produção de gás por *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63, e LMA72, foi seguida metodologia descrita por NCHE *et al.* (1994). Garrafas lacradas contendo 5 mL de polpa de manga diluída preparada anaerobiamente com pH ajustado para 4,0 foram inoculadas com 10⁶ UFC/mL dos isolados. Seringas de 10 mL com êmbolo lubrificado com glicerina foram acopladas às garrafas com a cultura e a agulha foi introduzida através da rolha até atingir o espaço de gás, acima do nível da polpa de manga. As garrafas foram incubadas a 30 °C. O volume de gás produzido foi medido em função do deslocamento do êmbolo das seringas ao longo do tempo de incubação. O experimento foi realizado em duas repetições e em duplicata, utilizando tratamento controle (sem bacteriocina) e polpa de manga acrescida de concentração de 100 UA/mL de bovicina HC5. Os resultados obtidos representam a média das repetições.

3.11. Efeito de bovicina HC5 sobre a germinação de esporos dos isolados anaeróbios facultativos

Para avaliar o efeito da bovicina HC5 na germinação de esporos, aproximadamente, 10⁷ esporos foram plaqueados em meio BHI sólido contendo 80 UA/mL de bovicina HC5. O efeito na germinação também foi verificado em polpa de manga diluída, onde, aproximadamente, 10⁷ esporos/mL foram inoculados em tubos

contendo 7 mL de polpa de manga (pH 4,0) sem bovicina HC5 (tratamento controle) e na presença de 80 UA/mL da bacteriocina. A amostra recebeu tratamento de 70 °C por 20 min para ativação dos esporos. Nos tempos 0, 6, 12, 24, 36, 60, 84 e 122 h alíquotas de 500 µL foram retiradas e submetidas a tratamento térmico de 70 °C por 20 min para inativação de células vegetativas e a quantificação de esporos foi feita em meio BHI sólido pela técnica de microgotas descrita no item 3.9. O plaqueamento foi realizado em triplicata. O número de esporos que germinaram foi determinado como o número de esporos inicial menos o número de esporos final, em cada tempo. O resultado obtido representa a média da triplicata.

3.12. Determinação do valor *D* de esporos em polpa de manga diluída

A determinação do valor *D* dos isolados anaeróbios facultativos e do *A. acidoterrestris* em polpa de manga diluída com pH 4,0 foi feita utilizando a temperatura de 80 °C. Foram utilizados tubos de aço inoxidável AISI 304 de 7,4 mm x 127 mm e com paredes de 0,25 mm de espessura. Esses tubos, contendo 2,7 mL de polpa de manga, pré-aquecida na temperatura a ser avaliada, foram inoculados com uma população de 10⁵ ou 10⁹ esporos/mL dos isolados da polpa de manga e de 10⁵ esporos/mL de *A. acidoterrestris*. Os mesmos procedimentos foram utilizados para a determinação do valor *D* na presença de bovicina HC5 e de nisina, ambas na concentração de 80 UA/mL.

Nos tempos 5, 10, 15, 20 e 25 minutos, os tubos foram resfriados em banho de gelo e alíquotas de 100 µL foram retiradas assepticamente e transferidas para solução salina para realização das diluições seriadas necessárias. A contagem de esporos sobreviventes foi feita pela técnica de microgotas utilizando ágar BHI para os isolados da polpa de manga e ágar AAM para o *A. acidoterrestris*. Nos tempos 5 min e 10 min, foram plaqueadas as diluições de 10⁻² a 10⁻⁷, nos tempos 15 min e 20 min, 10⁻¹ a 10⁻⁶ e no tempo 25 min, 10⁰ a 10⁻⁵. Os plaqueamentos foram feitos em triplicata e as placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. O experimento foi realizado em três repetições e os resultados obtidos representam a médias destas repetições. Comparação estatística

entre a média do controle e das amostras acrescidas de bovicina HC5 e nisina foi feita utilizando o teste de Tukey ao nível de significância de 5 %.

As curvas de sobreviventes foram traçadas usando os dados do número de esporos sobreviventes na ausência e na presença de bovicina HC5 ou nisina e os dados foram ajustados por meio de regressão linear segundo a equação $\log N = \log N_0 - bt$, em que N é o número de sobreviventes; N_0 é o número inicial de esporos; t é o tempo de exposição à temperatura de tratamento; e b é o coeficiente angular para a curva de sobreviventes atravessar um ciclo logarítmico. O valor D foi calculado plotando-se o log do número de sobreviventes versus o tempo, sendo $D = 1/b$, o inverso da inclinação da reta obtida.

3.13. Avaliação do desenvolvimento de resistência dos isolados da polpa de manga à bovicina HC5

Para verificar o desenvolvimento de resistência à bovicina HC5, os isolados foram transferidos por 10 vezes consecutivas, o que correspondeu a aproximadamente 40 gerações, em caldo BHI acrescido de 20 UA/mL do extrato de bovicina HC5, uma dose subletal da bacteriocina. Após este procedimento, as culturas previamente tratadas com bovicina HC5 foram expostas a concentrações de 40, 80 e 160 UA/mL da bacteriocina e o crescimento foi monitorado pela leitura da densidade óptica a 600 nm durante incubação a 30 °C. Os resultados obtidos foram comparados às curvas realizadas com células que não foram previamente expostas à bacteriocina. O experimento foi realizado em duplicata e o resultado obtido representa a média dos tratamentos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados anaeróbios facultativos

Testes bioquímicos e morfológicos realizados com os isolados anaeróbios facultativos (LMA09, LMA19 e LMA65) indicaram que, dos três isolados utilizados neste estudo, dois pertencem à espécie *B. thuringiensis* e um à espécie *B. cereus* (Tabela 2). Os três isolados são bastonetes Gram-positivos formadores de esporos e catalase positivos. Reduzem nitrato a nitrito, são móveis e têm capacidade de decompor tirosina. Nos isolados LMA09 e LMA65 foi constatada a presença de corpos de inclusão cristalina, o que classifica esses isolados como da espécie *B. thuringiensis* (Tabela 2). De agora em diante esses isolados serão designados como *B. thuringiensis* LMA09, *B. thuringiensis* LMA65 e *B. cereus* LMA19.

4.2. Estabilidade da bovicina HC5 no sobrenadante dos isolados e em polpa de manga

Quando o extrato de bovicina HC5 foi tratado com mesmo volume do sobrenadante dos isolados da polpa de manga deteriorada, não foi observada diminuição do halo de inibição da bactéria indicadora *L. lactis* ATCC 19435 (Tabela 3). Exceção é feita para o sobrenadante de *C. tyrobutyricum* LMA72 que causou diminuição de, aproximadamente, 12,5 % no diâmetro do halo de inibição da cultura

indicadora (Tabela 3). Entretanto, quando bovicina HC5 foi tratada com proteinase K, uma enzima que não afeta significativamente a atividade desta bacteriocina (MANTOVANI *et al.*, 2002), o efeito foi mais pronunciado (18,75 %) do que o efeito causado pelo sobrenadante de *C. tyrobutyricum* LMA72 (Tabela 3). Considerando este fato e os resultados obtidos neste estudo a respeito do efeito da bovicina HC5 contra *C. tyrobutyricum* LMA72 em polpa de manga e em caldo BHI, possivelmente essa alteração no halo de inibição não é relevante.

Tabela 2. Características bioquímicas e morfológicas dos isolados de *Bacillus* da polpa de manga deteriorada. Resultados típicos para *B. cereus* e *B. thuringiensis* descritos no Manual de Bergey* também são mostrados

Microrganismo	<i>Bacillus thuringiensis</i> LMA09	<i>Bacillus thuringiensis</i> LMA65	<i>Bacillus cereus</i> LMA19	<i>Bacillus thuringiensis</i> *	<i>Bacillus cereus</i> *
Coloração de Gram	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	+	+
Redução de Nitrato	+	+	+	+	+
Hemólise em sangue de carneiro	+	+	+	+	+
Decomposição de tirosina	+	+	+	+	+
Corpos de inclusão cristalina	+	+	-	+	-

Para descartar o efeito inibidor dos isolados contra o microrganismo indicador *L. lactis* ATCC 19435, o teste também foi realizado utilizando como controle, o sobrenadante dos isolados sem bacteriocina. Foi verificado que os isolados avaliados não produzem nenhuma substância que inibe o crescimento de *L. lactis* ATCC 19435 (Tabela 3). A bacteriocina também permaneceu estável após incubação com a polpa de manga e em caldo BHI, utilizado para o cultivo dos microrganismos (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do sobrenadante de bactérias isoladas de polpa de manga deteriorada e de enzimas proteolíticas sobre a bovicina HC5. *L. lactis* ATCC 19435 foi utilizado como microrganismo indicador

Tratamento	Halo de Inibição (mm)	
	Bovicina HC5	Controle
<i>B. thuringiensis</i> LMA09*	16	0
<i>B. cereus</i> LMA19*	16	0
<i>B. thuringiensis</i> LMA65*	16	0
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA45*	16	0
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA63*	16	0
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA72*	14	0
Tripsina	8	-
Proteinase K	13	-
BHI	16	-
Polpa de manga	16	-
Tampão fosfato pH 2,0	16	0

*Sobrenadante dos isolados

4.3. Efeito de bovicina HC5 sobre células vegetativas inoculadas em caldo BHI

Os isolados LMA09 e LMA65 de *B. thuringiensis* e LMA19 de *B. cereus* cresceram em caldo BHI a 30 °C com velocidades específicas de crescimento de 0,60, 0,50 e 0,38 h⁻¹ e a DO final atingida por essas culturas foi de 0,87, 0,90 e 1,08, respectivamente (Tabela 4). A adição de bovicina HC5 ao caldo BHI, reduziu a velocidade específica de crescimento e a DO máxima atingida pelas culturas (Tabela 4). Concentrações de 40 e 80 UA/mL de bovicina HC5 resultaram no aumento da fase lag dos isolados em, pelo menos, 8 e 16 h, respectivamente, e quando bovicina HC5 foi utilizada na concentração de 160 UA/mL o crescimento foi inibido por um período de incubação superior a 144 h (Tabela 4).

A adição de mesmas concentrações de nisina (40, 80 e 160 UA/mL) ao caldo BHI, também reduziu a velocidade específica de crescimento, mas a DO final atingida

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de bovicina HC5 e nisina sobre o crescimento de células vegetativas inoculadas em caldo BHI

Isolado	Bacteriocina (UA/mL)	μ (h^{-1})		Fase Lag (h)		DO _{600nm}	
		Bovicina HC5	Nisina	Bovicina HC5	Nisina	Bovicina HC5	Nisina
<i>B. thuringiensis</i> LMA09	0	0,60	0,60	2	2	0,87	0,87
	40	0,42	0,37	> 24	8	0,64	0,94
	80	0,33	0,23	> 60	10	0,57	0,87
	160	-	0,17	> 144	10	-	0,92
<i>B. thuringiensis</i> LMA65	0	0,50	0,50	2	2	0,90	0,89
	40	0,21	0,28	> 12	7	0,73	0,91
	80	-	0,11	> 144	10	0,66	0,94
	160	-	0,08	> 144	12	-	0,88
<i>B. cereus</i> LMA19	0	0,38	0,38	2	2	1,08	1,05
	40	0,21	0,24	10	12	0,72	0,82
	80	0,13	0,15	18	>12	0,67	0,88
	160	-	0,04	> 144	24	-	0,88
<i>C. tyrobutyricum</i> . LMA45	0	0,20	0,20	6	6	0,92	0,92
	40	-	0,12	> 144	12	-	0,96
	80	-	ND	> 144	>17	-	0,98
	160	-	ND	> 144	>17	-	0,91
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA63	0	0,17	0,17	6	6	1,00	1,00
	40	0,15	-	13	> 144	0,64	-
	80	0,14	-	14	> 144	0,55	-
	160	-	-	> 144	> 144	-	-
<i>C. tyrobutyricum</i> LMA72	0	0,22	0,22	3	3	1,05	1,05
	40	-	-	> 144	> 144	-	-
	80	-	-	> 144	> 144	-	-
	160	-	-	> 144	> 144	-	-

(ND) Não determinado

(-) Não houve crescimento

foi igual ou superior à DO do tratamento controle (Tabela 4). *B. thuringiensis* LMA09 e LMA65 tiveram a velocidade específica de crescimento reduzida em 71,7 % e 44,0 % respectivamente na presença de 40 UA/mL de nisina (Tabela 4). A duração da fase lag das células cultivadas nas concentrações de 40, 80 e 160 UA/mL de nisina foi de no máximo 12, 12 e 24 h, respectivamente (Tabela 4).

A velocidade específica de crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63 e LMA72 em caldo BHI a 30 °C foi de 0,20, 0,17 e 0,22 respectivamente (Tabela 4). Concentrações de 40, 80 e 160 UA/mL de bovicina HC5 inibiram o crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA45 e LMA72 por um período de incubação superior a 144 h. *C. tyrobutyricum* LMA63 teve a fase lag prolongada por 7 h e 8 h na presença de concentrações de 40 e 80 UA/mL, respectivamente, e a velocidade específica de crescimento na presença destas concentrações de bacteriocina foi cerca de 12 % e 18 % menor, respectivamente (Tabela 4). A DO máxima atingida por células cultivadas na presença de bovicina HC5 foi sempre menor que o tratamento controle (Tabela 4).

Quando as mesmas concentrações de nisina foram utilizadas, o crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA63 e LMA72 não foi observado por um período de incubação superior a 144 h (Tabela 4). *C. tyrobutyricum* LMA45 teve fase lag prolongada por 6 h na presença de concentração de 40 UA/mL de nisina e com o aumento da concentração para 80 e 160 UA/mL, o crescimento foi inibido por um período superior a 17 h. A DO máxima atingida pelas culturas foi próxima a do tratamento controle (Tabela 4).

4.4. Efeito de bovicina HC5 sobre células vegetativas inoculadas em polpa de manga diluída

Após 12 horas de incubação a 30 °C, populações iniciais de 10^5 ou 10^6 UFC/mL dos isolados avaliados alcançaram números iguais ou superiores a 10^7 UFC/mL quando o pH da polpa de manga diluída variou de 4,0 a 7,0 (Figura 1 e 2). Exceção é feita para o isolado *B. thuringiensis* LMA09 que não apresentou crescimento em polpa de manga com pH 4,0 (Figura 1a). Na presença de concentrações de 100 UA/mL de

bovicina HC5, a viabilidade celular após 12 h de incubação foi menor em valores de pH abaixo de 7,0 (Figura 1 e 2).

O número de células viáveis dos isolados *B. thuringiensis* LMA09 e LMA65 e *B. cereus* LMA19 ficou abaixo do limite de detecção (10^2 UFC/mL) em valores de pH igual ou inferior a 5,0, 5,5 e 4,0, respectivamente (Figura 1). Em valores de pH acima de 5,5, o número de células viáveis foi pelo menos dois ciclos log menor do que o tratamento controle para os isolados *B. thuringiensis* LMA09 e *B. cereus* LMA19 (Figura 1a e 1c). Não foi observada inibição de *B. thuringiensis* LMA65 pela bovicina HC5 em polpa de manga com pH 7,0 (Figura 1b). O efeito de mesma concentração de nisina (100 UA/mL) contra esses isolados foi, de uma maneira geral, mais pronunciado em diminuir a viabilidade das culturas no período de 12 h de incubação, exceto para *B. thuringiensis* LMA09 (Figura 1). Entretanto, em valor de pH 4,0, geralmente utilizado na indústria processadora de polpas e sucos, o efeito da nisina e da bovicina HC5 foi semelhante (Figura 1).

Após 12 h de incubação na presença de 100 UA/mL de bovicina HC5, o número de células viáveis de *C. tyrobutyricum* LMA45 ficou abaixo do limite de detecção (10^2 UFC/mL), independente do valor de pH (Figura 2a). A viabilidade celular de *C. tyrobutyricum* LMA63 e LMA72, na presença de bovicina HC5, após 12 h foi menor em valores de pH mais baixos (4,0 a 5,5), sendo observado um decréscimo de, pelo menos, três ciclos log, no número de UFC/mL em relação ao controle (Figura 2b e c). Em valores de pH superiores, a contagem de células destes isolados foi sempre menor do que o tratamento controle, sendo a diferença de pelo menos dois ciclos log (Figura 2b e c). Com a adição de 100 UA/mL de nisina em polpa de manga diluída, o número de células viáveis de *C. tyrobutyricum* LMA45 foi menor em valores de pH mais baixos, sendo esse número pelo menos três ciclos log inferior ao do tratamento controle (Figura 2a). O número de células viáveis de *C. tyrobutyricum* LMA63 e LMA72 após 12 h de incubação ficou abaixo do limite de detecção (10^2 UFC/mL), independente do valor de pH (Figura 2b e c).

Após 24 h de incubação, culturas dos isolados de *Bacillus* e *Clostridium* inoculadas em polpa de manga diluída (pH 4,0) sem bacteriocina (tratamento controle)

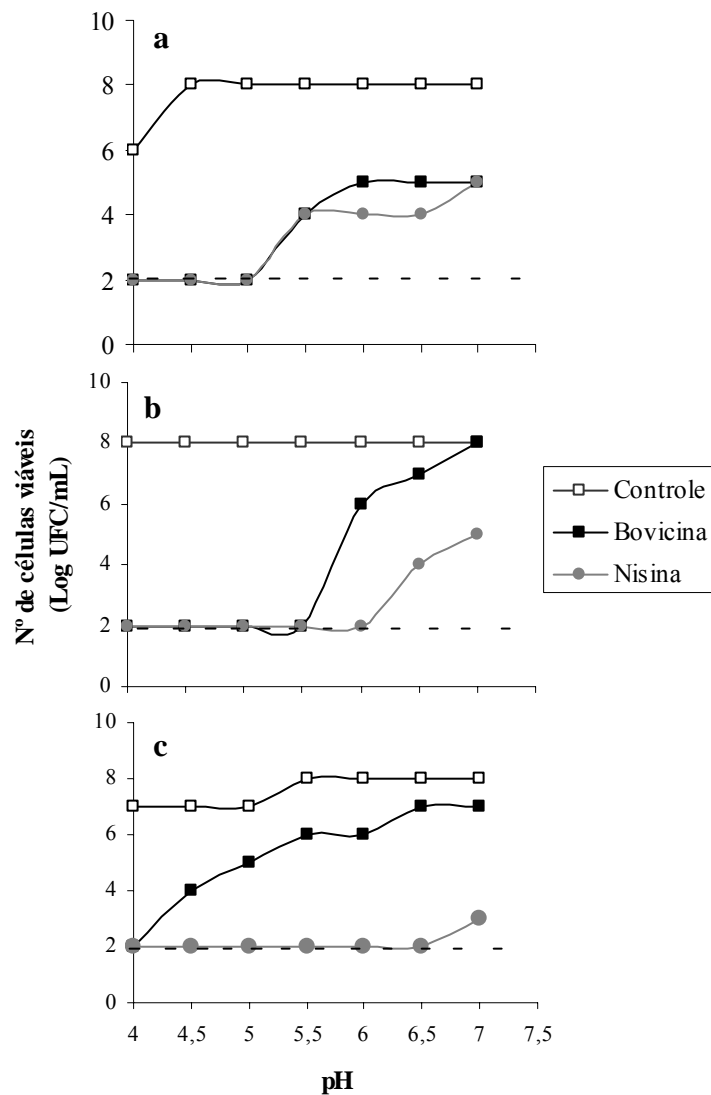


Figura 1. Logaritmo do número de células viáveis dos isolados *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c) inoculados (10^6 UFC/mL) em polpa de manga diluída com diferentes valores de pH. Bovicina HC5 e nisina foram adicionadas na concentração de 100 UA/mL. Controle sem bacteriocina também é mostrado. Após 12 h de incubação a 30 °C, o número de células viáveis foi determinado. A linha pontilhada indica o limite de detecção do método utilizado. O desvio padrão das médias foi inferior a 10 %.

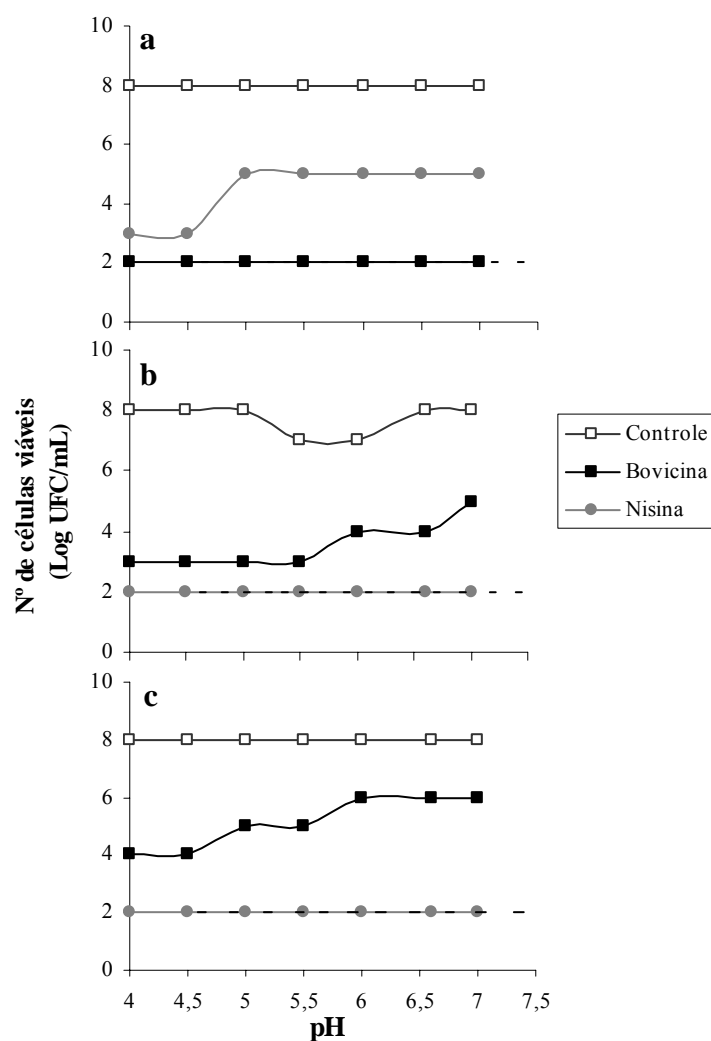


Figura 2. Logaritmo do número de células viáveis de *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c) inoculados (10^6 UFC/mL) em polpa de manga diluída com diferentes valores de pH. Bovicina HC5 e nisina foram adicionadas na concentração de 100 UA/mL. Controle sem bacteriocina também é mostrado. Após 12 h de incubação a 30 °C, o número de células viáveis foi determinado. A linha pontilhada indicada o limite de detecção do método utilizado. O desvio padrão das médias foi inferior a 10 %.

atingiram população de 10^9 UFC/mL (Figura 3 e 4). Esse resultado indica que os isolados crescem bem em polpa de manga, mesmo em valores de pH baixo. Na presença de bovicina HC5 e nisina, o número de células viáveis ficou abaixo do limite de detecção (10^2 UFC/mL) durante esse mesmo período de incubação (Figura 3 e 4).

Após 24 h, observou-se redução do número de células viáveis abaixo do limite de detecção, independente do valor de pH. Os resultados obtidos indicam que tanto a nisina quanto a bovicina HC5 exerceram efeito bactericida contra os isolados e, de uma maneira geral, maior efetividade em condições acídicas.

4.5. Efeito de bovicina HC5 sobre a produção de gás por células vegetativas inoculadas em polpa de manga diluída

A produção de gás em polpa de manga diluída com pH ajustado para 4,0 por *C. tyrobutyricum* LMA45 e LMA63, inoculados com uma população inicial de 10^6 UFC/mL, foi observada a partir de 4 h de incubação (Figura 5a e b). Nas mesmas condições, a produção de gás por *C. tyrobutyricum* LMA72 ocorreu após 12 h de incubação (Figura 5c). A produção máxima observada foi de 18,6, 12,6 e 22,0 mL por *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63 e LMA72, respectivamente, após 105 h de incubação (Figura 5). *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63 e LMA72 produziram gás a uma taxa de 0,22, 0,13 e 0,19 mL h⁻¹, respectivamente. Quando bovicina HC5, na concentração de 100 UA/mL, foi adicionada em polpa de manga, produção de gás não foi observada por um período de incubação de até 10 dias a 30 °C.

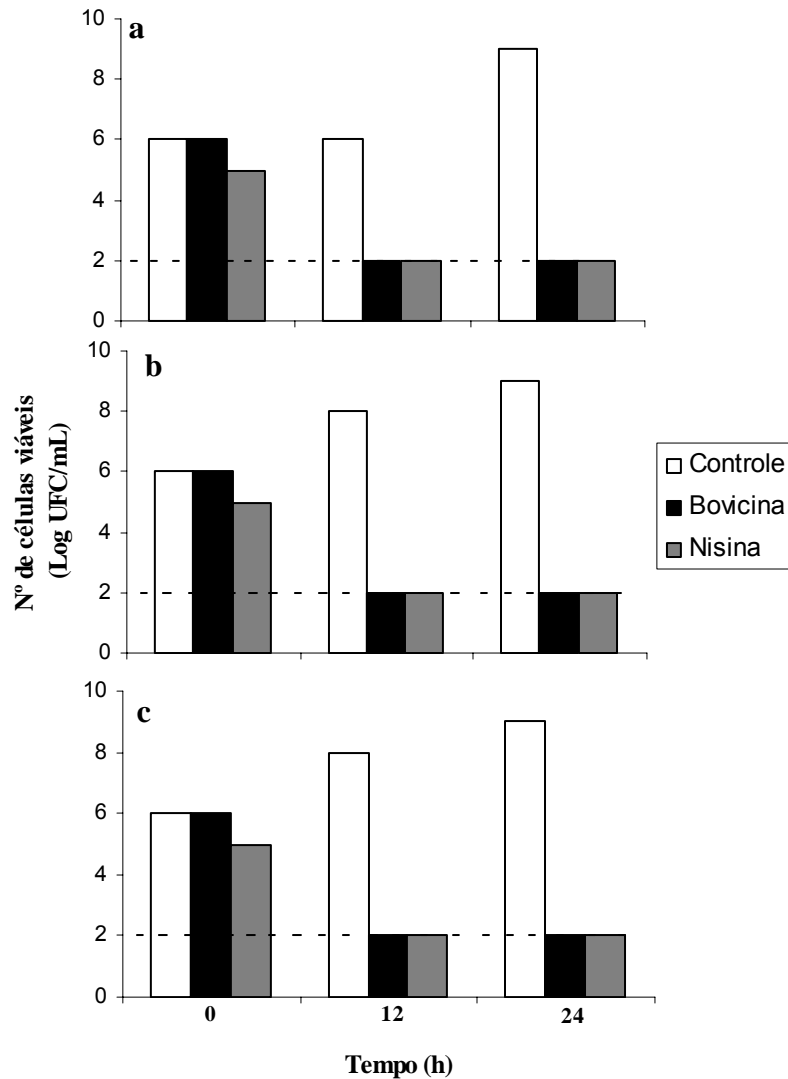


Figura 3. Efeito bactericida de bovicina HC5 e nisina contra *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c) em polpa de manga diluída com pH 4,0. Aproximadamente 10^6 UFC/mL dos isolados foram inoculadas em polpa de manga na ausência de bacteriocina (controle) e na presença de 100 UA/mL de bovicina HC5 e nisina. Nos tempos 0, 12 e 24 h de incubação a 30 °C, alíquotas foram retiradas e o número de células viáveis foi determinado. A linha pontilhada indicada o limite de detecção do método utilizado. O desvio padrão das médias foi inferior a 10 %.

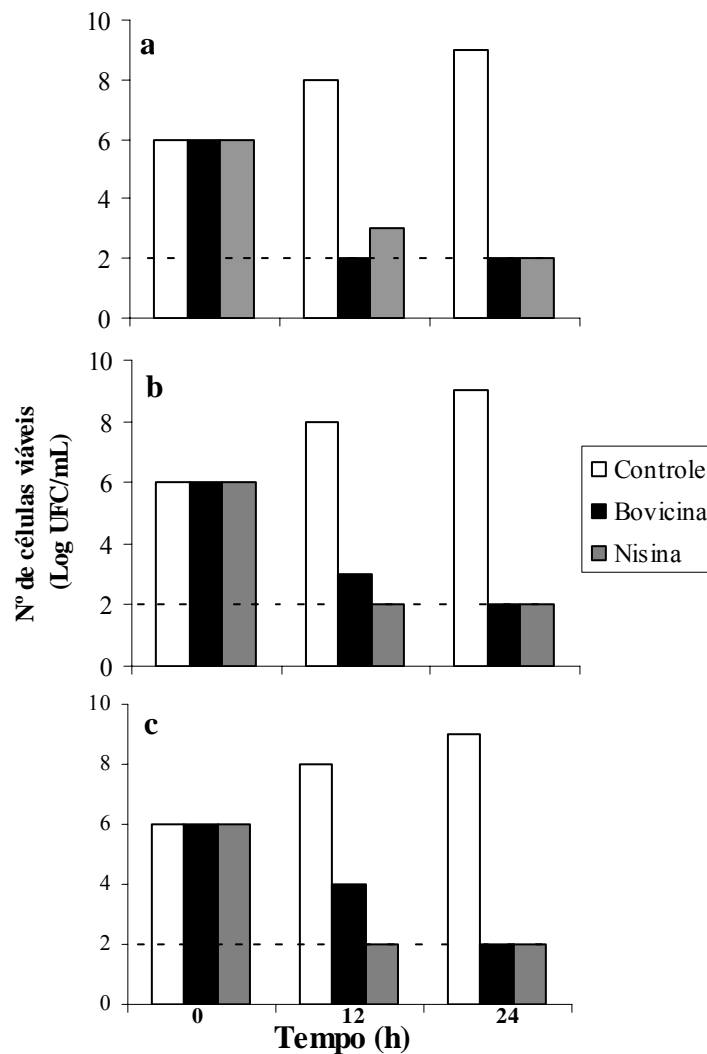


Figura 4. Efeito bactericida de bovicina HC5 e nisina contra *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c) em polpa de manga diluída com pH 4,0. Aproximadamente 10^6 UFC/mL dos isolados foram inoculadas em polpa de manga na ausência de bacteriocina (controle) e na presença de 100 UA/mL de bovicina HC5 e nisina. Nos tempos 0, 12 e 24 h de incubação a 30 °C, alíquotas foram retiradas e o número de células viáveis foi determinado. A linha pontilhada indicada o limite de detecção do método utilizado. O desvio padrão das médias foi inferior a 10 %.

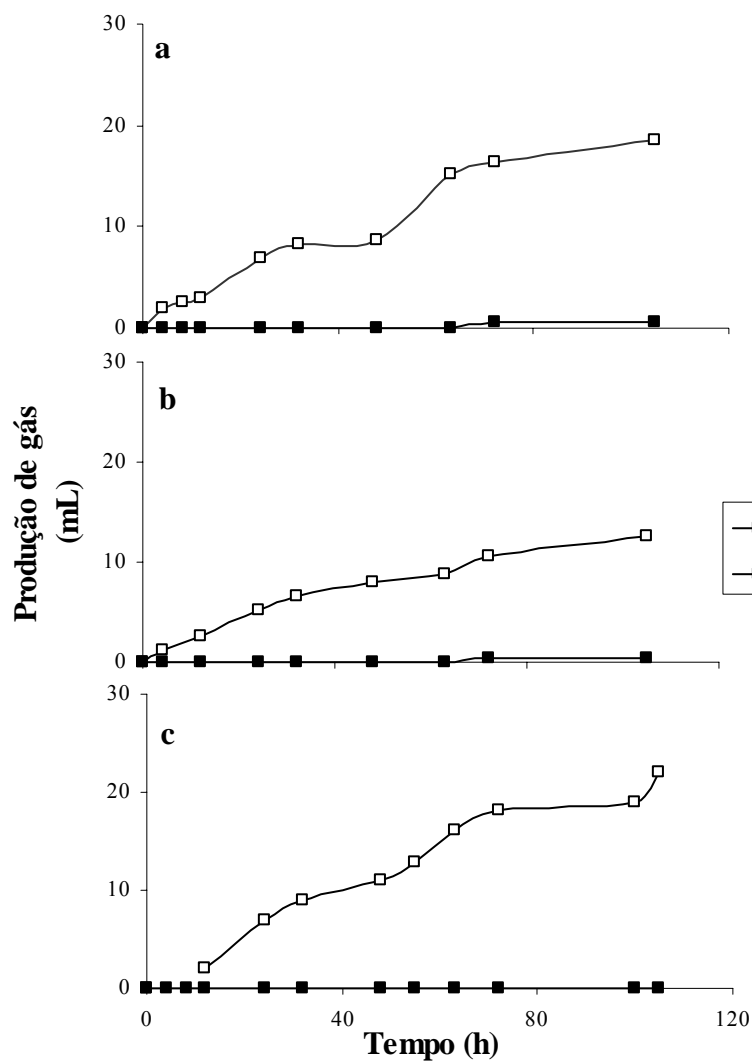


Figura 5. Efeito de 100 UA/mL de bovicina HC5 sobre a produção de gás por *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c). Cerca de 10^6 UFC/mL dos isolados foram inoculadas em polpa de manga diluída (pH 4,0) preparada anaerobiamente e acondicionada em garrafas seladas com rolha de borracha e lacre de alumínio. A produção de gás foi acompanhada através de seringas que foram acopladas às garrafas das culturas.

4.6. Efeito de bovicina HC5 na germinação de esporos

O plaqueamento de, aproximadamente, 10^7 esporos/mL dos isolados *B. thuringiensis* LMA09, LMA65 e *B. cereus* LMA19 em meio BHI contendo concentração de 80 UA/mL de bovicina HC5 não resultou na formação de colônias visíveis, mesmo após 48 h de incubação (Figura 6). Quando a mesma população de esporos foi inoculada em polpa de manga com pH ajustado para 4,0, foi observada a germinação de esporos a partir de 6 h de incubação. O número de esporos presentes na polpa de manga diminuiu rapidamente após 36 h. Somente 0,01 % do número inicial de esporos de *B. thuringiensis* LMA09 e LMA65 e 0,1 %, do número inicial de esporos de *B. cereus* LMA19 permaneceu no estado dormente após 122 h de incubação (Figura 7). Este resultado indicou que o pH baixo não foi suficiente para inibir a germinação de esporos desses microrganismos.

Na presença de 80 UA/mL bovicina HC5, aproximadamente 10 % dos esporos dos isolados *B. thuringiensis* LMA09, *B. cereus* LMA19 e *B. thuringiensis* LMA65 não germinaram por, pelo menos, 84 h de incubação (Figura 7). Bovicina HC5 reduziu a germinação de esporos dos isolados avaliados e o número de esporos no estado dormente após 122 h de incubação foi, pelo menos, 100 vezes maior do que o tratamento controle sem bacteriocina (Figura 7). Esse resultado indica que a bovicina HC5 pode reduzir a germinação de esporos dos isolados *B. thuringiensis* LMA09, *B. cereus* LMA19 e *B. thuringiensis* LMA65 em polpa de manga.

4.7. Efeito de bovicina HC5 na resistência térmica de esporos inoculados em polpa de manga diluída

Os tempos de redução decimal (valor D), em minutos, foram calculados, por regressão, a partir das curvas de sobreviventes de esporos de *B. thuringiensis* LMA09, LMA65 e *B. cereus* LMA19. O valor $D_{80^\circ\text{C}}$ dos isolados foi semelhante (Tabela 5). Na presença de 80 UA/mL de bovicina HC5 não foi observada variação significativa no valor $D_{80^\circ\text{C}}$ ($P < 0,05$) em comparação com o controle (Tabela 5; Figura 8). Entretanto, quando nisina foi utilizada, foi observado aumento significativo ($P < 0,05$)

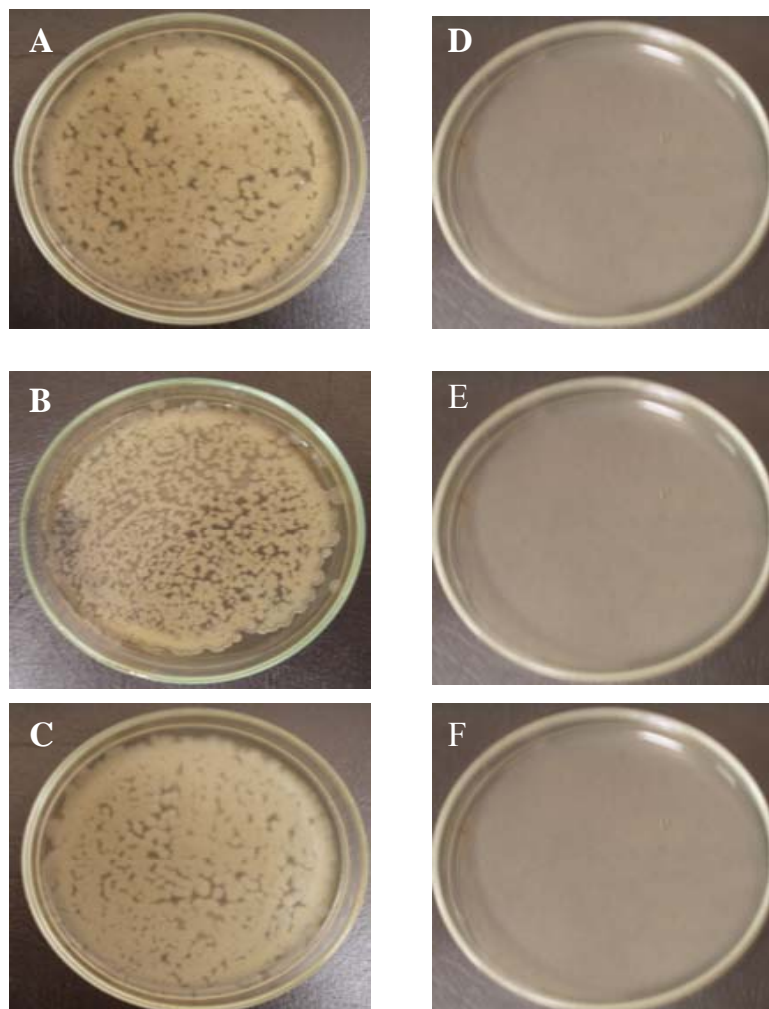


Figura 6. Efeito da bovicina HC5 na germinação de esporos de *B. thuringiensis* LMA09 (d), *B. thuringiensis* LMA65 (e) e *B. cereus* LMA19 (f). Aproximadamente 10^7 esporos/mL foram inoculados em meio BHI contendo 80 UA/mL de bovicina HC5 e as placas foram incubadas a 30 °C por 48 h. Tratamento controle sem bacteriocina também é mostrado para *B. thuringiensis* LMA09 (a), LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c).

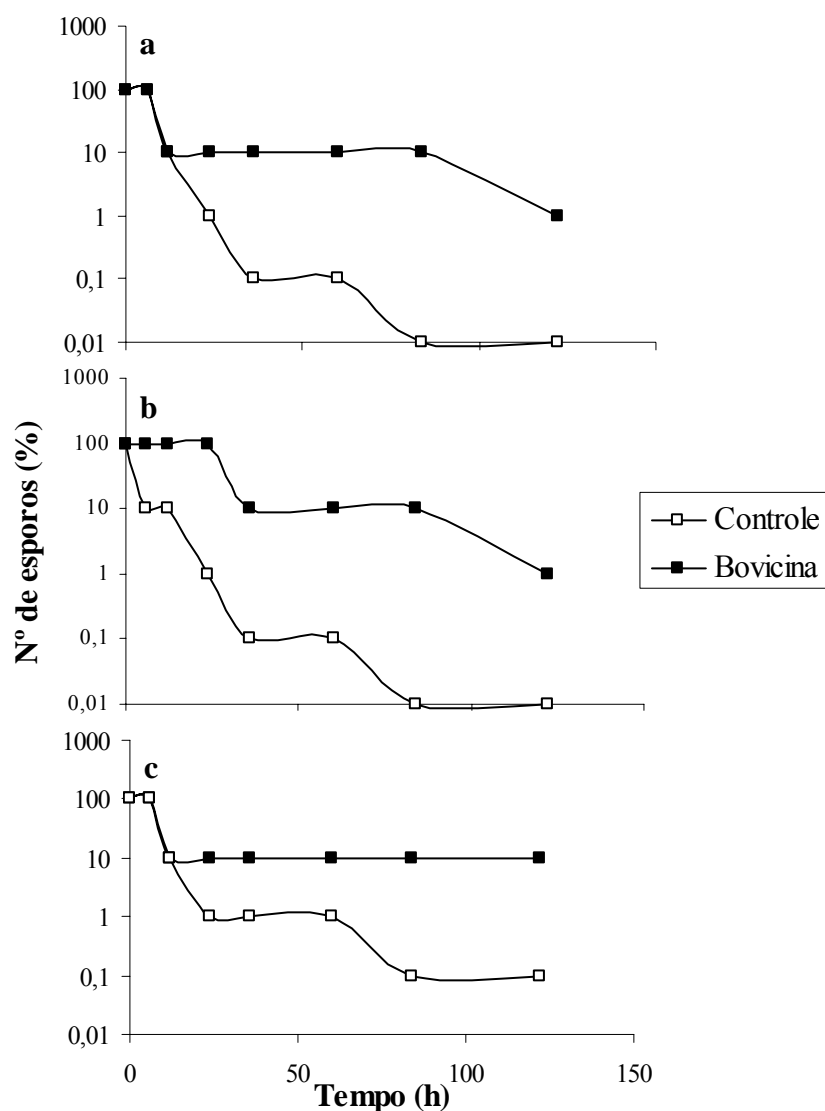


Figura 7. Número de esporos viáveis de *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c) inoculados em polpa de manga diluída. Aproximadamente 10^7 esporos/mL dos isolados foram inoculados em polpa de manga (pH 4,0) na ausência de bacteriocina (controle) ou na presença de 80 UA/mL de bovicina HC5. Os isolados foram cultivados a 30 °C e nos tempos 0, 6, 12, 24, 36, 84 e 122 h de incubação, alíquotas foram retiradas, tratadas a 70 °C para inativar células vegetativas e o número de esporos que não germinaram foi determinado. Desvio padrão das médias foi inferior a 10 %.

no valor $D_{80^{\circ}\text{C}}$ de, aproximadamente, 26,2 % e 28,5 % para *B. thuringiensis* LMA09 e *B. cereus* LMA19, respectivamente (Tabela 5). A variação no inóculo inicial de esporos (10^5 e 10^9) não interferiu na resistência térmica dos isolados na presença da bovicina HC5 e nisina, e o valor $D_{80^{\circ}\text{C}}$ calculado foi semelhante em ambas condições.

Quando polpa de manga foi inoculada com 10^5 esporos/mL de *A. acidoterrestris*, utilizado como cultura de referência neste estudo, e tratado nas mesmas condições adotadas para os isolados da polpa de manga, o valor $D_{80^{\circ}\text{C}}$ foi igual a 40, confirmando a termorresistência desse microrganismo em relação a outras espécies, como os isolados de *Bacillus* utilizados neste estudo. Na presença de bovicina HC5 ou nisina, foi observada diminuição significativa ($P < 0,05$) no tempo de redução decimal do *A. acidoterrestris* em 77 % e 75 %, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Tempo de redução decimal ($D_{80^{\circ}\text{C}}$) de esporos bacterianos em polpa de manga diluída (pH 4,0) sem bacteriocina (controle) e na presença de bovicina HC5 e nisina

Microrganismo	$D_{80^{\circ}\text{C}}$ (min)*		
	Controle	Bovicina HC5	Nisina
<i>B. thuringiensis</i> LMA09	5,69 ^a	5,46 ^a	7,18 ^b
<i>B. thuringiensis</i> LMA65	5,63 ^a	6,32 ^a	6,09 ^a
<i>B. cereus</i> LMA19	5,83 ^a	5,69 ^a	7,49 ^b
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> DSMZ2498	40 ^a	9,2 ^b	9,71 ^b

* média de três repetições

^{a, b} Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

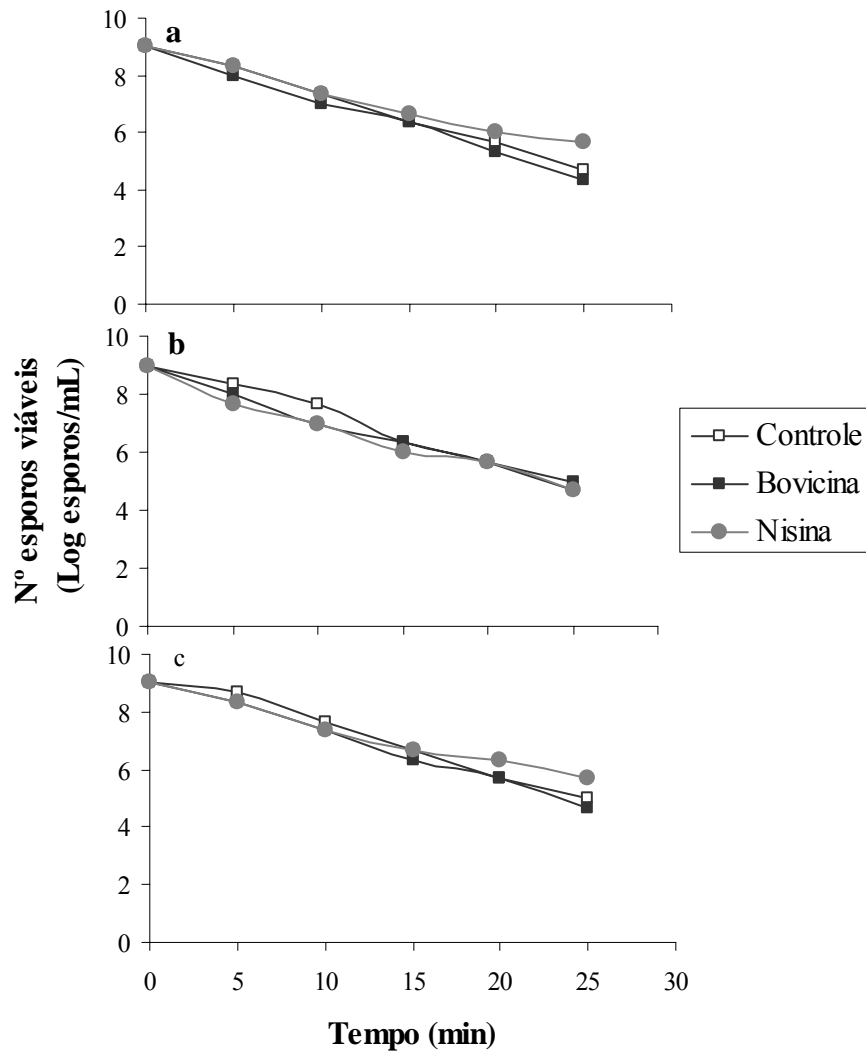


Figura 8. Curva de sobrevivência de esporos de *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c). Cerca de 10^9 esporos dos microrganismos foram inoculados em polpa de manga diluída com pH ajustado para 4,0. O valor $D_{80^{\circ}C}$ foi determinado para o tratamento controle e para amostras acrescidas de bovicina HC5 e nisina na concentração de 80 UA/mL. O desvio padrão das médias foi inferior a 10 %.

4.8. Desenvolvimento de resistência à bovicina HC5

Culturas dos isolados de polpa de manga foram transferidas na presença de 20 UA/mL de bovicina HC5 por 10 vezes consecutivas (aproximadamente 40 gerações) e testadas quanto ao desenvolvimento de resistência à bacteriocina. O isolado *B. cereus* LMA19 não cresceu na presença de doses previamente inibitórias (Figura 9b). Culturas de *B. thuringiensis* LMA09 e *B. thuringiensis* LMA65 previamente tratadas com a bacteriocina cresceram na presença de dose previamente inibitória (80 UA/mL), mas a DO máxima atingida e a velocidade específica de crescimento foi menor em relação ao tratamento controle (Figura 9a e c).

Os isolados de *C. tyrobutyricum* previamente tratados com bovicina HC5 não conseguiram crescer na presença de doses previamente inibitórias (Figura 10). A duração da fase lag de *C. tyrobutyricum* LMA63 na presença de concentrações de 40 e 80 UA/mL de bovicina HC5 foi superior a 36 h, maior do que células não adaptadas (Figura 10; Tabela 3). Quando concentração de 160 UA/mL de bovicina HC5 foi utilizada, não foi observado crescimento por até 144 h de incubação, tanto para os isolados de *Clostridium* quanto para os isolados de *Bacillus* (Figura 9 e 10).

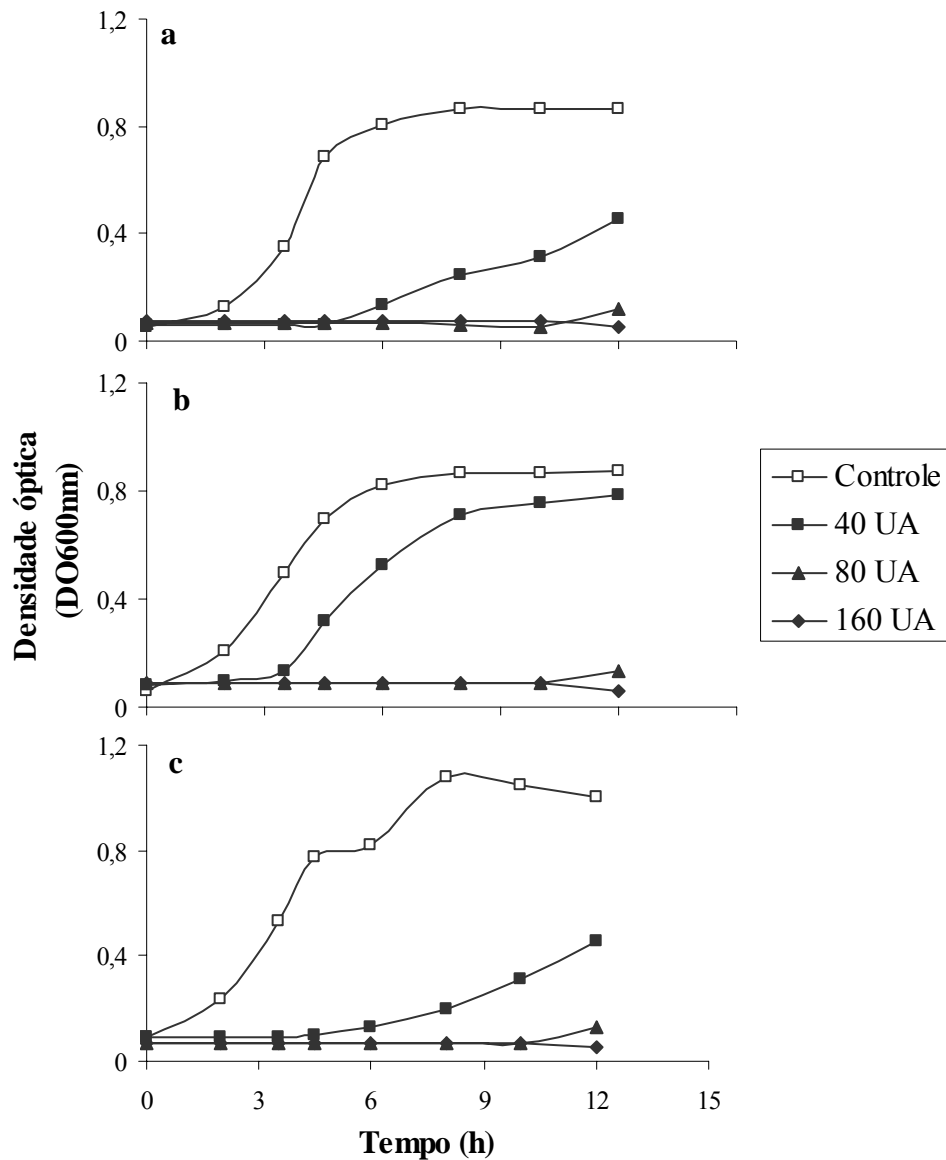


Figura 9. Efeito de doses subletais de bovicina HC5 no desenvolvimento de resistência por *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c). Culturas de cada isolado foram transferidas por 10 vezes consecutivas em caldo BHI acrescido de 20 UA/mL de bovicina HC5. Posteriormente, as culturas foram inoculadas na presença de doses superiores (40 a 160 UA/mL). Culturas que não tiveram contato prévio com a bacteriocina foram utilizadas como controle. As células foram incubadas a 30 °C e o crescimento foi monitorado pela leitura da DO a 600 nm.

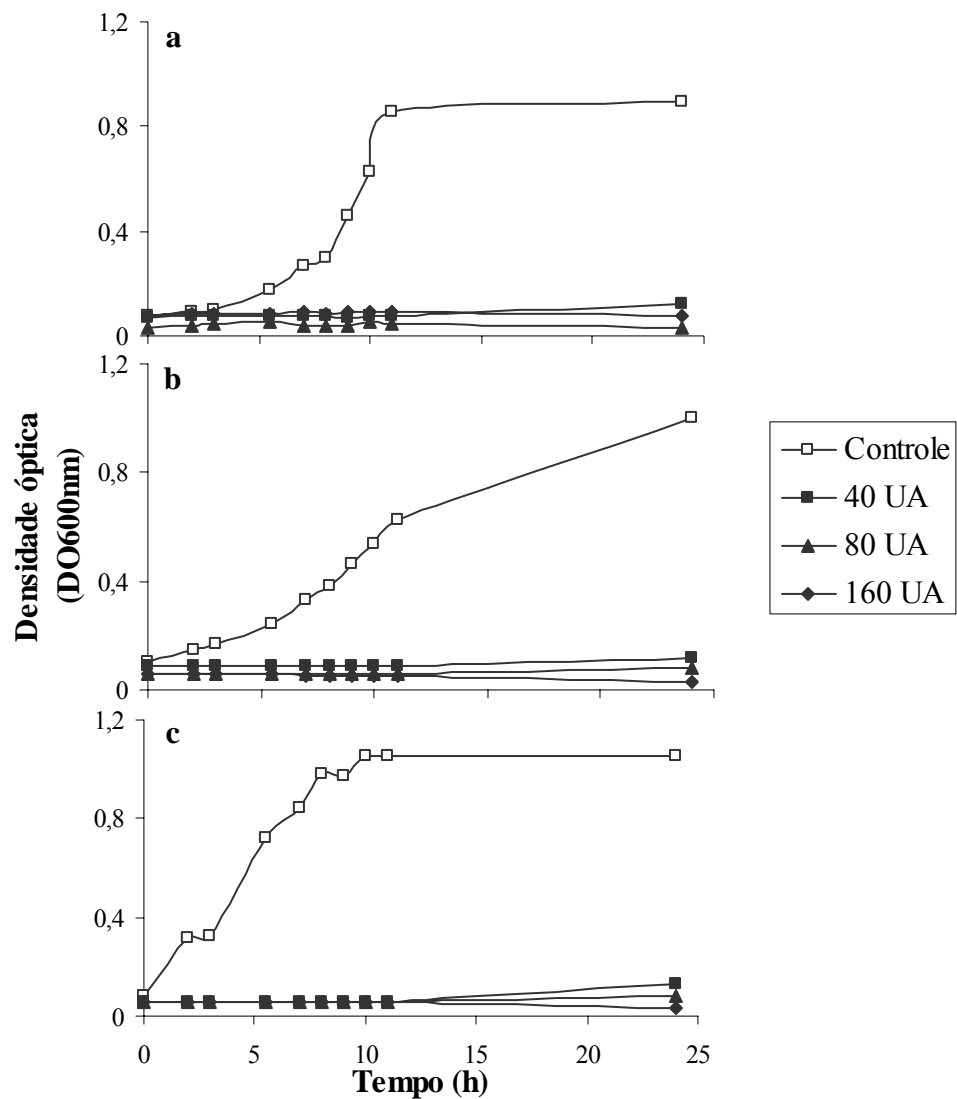


Figura 10. Efeito de doses subletais de bovicina HC5 no desenvolvimento de resistência por *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c). Culturas dos isolados foram transferidas por aproximadamente 40 gerações em caldo BHI acrescido de 20 UA/mL de bovicina HC5. Posteriormente, as culturas foram inoculadas na presença de doses superiores (40 a 160 UA/mL). Culturas que não tiveram contato prévio com a bacteriocina foram utilizadas como controle. A incubação foi a 30 °C e o crescimento foi monitorado pela leitura da DO a 600 nm.

5. DISCUSSÃO

O tratamento térmico intenso de alimentos, necessário para eliminar microrganismos formadores de esporos termorresistentes, danifica o produto pela desnaturação de proteínas, perda de vitaminas e de compostos voláteis responsáveis pelo sabor e odor (LADO e YOUSEF, 2002). Entre as alternativas propostas para a conservação de alimentos está o uso de bacteriocinas de bactérias lácticas, pois podem ser utilizadas conjuntamente com outros tratamentos, como tratamento térmico mais brando, sem afetar as características naturais do produto. Estas bacteriocinas têm o potencial de prevenir a ação de microrganismos deterioradores em alimentos e de inibir o crescimento de patógenos (ABEE, 1995; STILES, 1996).

Vários estudos têm demonstrado a eficácia dessas substâncias antimicrobianas contra microrganismos de alimentos, apesar de seu uso ser ainda limitado (KOMITOPOULOU *et al.*, 1999; YAMAZAKI *et al.*, 2000; GRANDE *et al.*, 2005). O efeito da bovicina HC5 em alimentos ainda não havia sido testado. A atividade *in vitro* desta bacteriocina contra *Clostridium sporogenes* (FLYTHE e RUSSELL, 2004) e *L. monocytogenes* (MANTOVANI e RUSSELL, 2003) já foi demonstrada. Neste estudo, esta bacteriocina também foi eficiente contra *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *C. tyrobutyricum* isolados de polpa de manga deteriorada.

A inibição do crescimento e eliminação de microrganismos deterioradores ou patogênicos por bacteriocinas durante o processamento e estocagem do produto é o

resultado das interações específicas entre a bacteriocina, o alimento e o microrganismo alvo (GÄNZLE *et al.*, 1999). Dessa maneira, a efetividade de bacteriocinas em alimentos pode ser afetada por alguns fatores como modificação na solubilidade da bacteriocina, ligação da bacteriocina a componentes do alimento, pH do alimento e inativação por proteases encontradas no alimento ou produzidas pelo microrganismo alvo (GÄNZLE *et al.*, 1999). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a bovicina HC5 permaneceu estável após incubação com o sobrenadante das culturas de *Bacillus* e *Clostridium* utilizadas e resultado similar foi obtido após incubação da bovicina HC5 com polpa de manga diluída. Pode-se concluir que a bovicina HC5 não interagiu com componentes da polpa de manga e nem é inativada pelo sobrenadante dos isolados.

No presente trabalho, a bovicina HC5 reduziu a velocidade específica de crescimento, aumentou a duração da fase lag e diminuiu a DO máxima atingida pelos isolados da polpa de manga deteriorada. Este resultado foi semelhante à atividade inibitória da nisina contra esses mesmos isolados. Considerando que a bovicina HC5 apresenta similaridade aos lantibióticos (MANTOVANI *et al.*, 2002), o efeito de ambas bacteriocinas contra os microrganismos alvo pode ser semelhante.

A atividade da bovicina HC5 contra células vegetativas de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e de *C. tyrobutyricum* inoculados em polpa de manga foi bactericida e mais pronunciada em condições acídicas. Resultado semelhante foi obtido quando a bacteriocina utilizada foi a nisina. MANTOVANI e RUSSELL (2003) também demonstraram que a atividade da bovicina HC5 em promover o efluxo intracelular de K^+ em *L. monocytogenes* foi maior em valores de pH inferiores a 6,0. Esses resultados também são condizentes com os resultados apresentados por HOULIHAN *et al.* (2004), que demonstraram que a atividade da bovicina HC5 foi dependente do pH. YAMAZAKI *et al.* (2000) também observaram que a atividade da nisina contra *A. acidoterrestris* foi maior em condições acídicas.

Um dos efeitos relacionados à deterioração causada por espécies de *Clostridium* geralmente está associada à produção de gás (AZIZI e RANGANNA, 1993; WILKES *et al.*, 2000). Neste estudo, a bovicina HC5 na concentração de 100 UA/mL inibiu a produção de gás pelos isolados de *Clostridium* inoculados em polpa de manga, por um

período de incubação superior a 10 dias. Uma vez que não foi observada produção de amônia em polpa de manga por *C. tyrobutyricum* LMA45, LMA63 e LMA72 provavelmente esse isolados são sacarolíticos e não proteolíticos. Clostrídeos sacarolíticos produzem CO₂ e H₂ como produto final da fermentação de carboidratos e a síntese de ATP ocorre principalmente através de fosforilação ao nível de substrato (DOELLE, 1975). Considerando que o efluxo de íons, como o K⁺, pode aumentar extrusão de H⁺ pela ATP sintase (CARNEIRO de MELO, 1996), a inserção de bacteriocinas na membrana de *C. tyrobutyricum* pode causar depleção do pool de ATP e, conseqüentemente, reduzir a atividade fermentativa.

Neste estudo, a bovicina HC5 foi eficaz contra *B. cereus* e *B. thuringiensis*, mesmo quando o inóculo inicial era de 10⁶ UFC/mL. Após 24 h de incubação com a bacteriocina, o número de células viáveis ficou abaixo do limite de detecção da técnica de contagem de colônias em placa. Esses microrganismos, além de deteriorarem o produto, constituem em risco para o consumidor devido à produção de toxinas (IURLINA *et al.*, 2006). A dose infecciosa de *B. cereus* em alimentos varia de 10³ a 10¹⁰ UFC por g de alimento (NOTERMANS e BATT, 1998). ROSENQUIST *et al.* (2005) fizeram o isolamento desse microrganismo e também de *B. thuringiensis* em alimentos e a contagem na maioria das amostras não ultrapassou 10³ UFC/g de alimento. Contagens mais altas foram obtidas principalmente a partir de alimentos que foram tratados termicamente (ROSENQUIST *et al.*, 2005). Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a bovicina HC5 pode ser efetiva no controle desses microrganismos em alimentos, mesmo se o grau de contaminação for alto, reduzindo a população a valores inferiores à dose infecciosa.

Neste trabalho, o efeito de pH baixo não foi suficiente para inibir a germinação de esporos das linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* inoculados em polpa de manga diluída. Geralmente, esporos de microrganismos termorresistentes, como *Clostridium botulinum*, *B. cereus* e outros não conseguem germinar em condições de pH abaixo de 4,5 (AZIZI e RANGANA, 1993; SETLOW e JOHNSON, 2001). Entretanto, *A. acidoterrestris* (YAMAZAKI *et al.*, 2000), *Bacillus coagulans* (AZIZI e RANGANA, 1993) e *Bacillus licheniformis* (PALOP *et al.*, 1996) têm sido citados como microrganismos cujos esporos conseguem germinar nessas condições.

A conversão do esporo em célula vegetativa envolve basicamente 4 etapas: ativação; germinação; desenvolvimento (*outgrowth*); e crescimento (SETLOW e JOHNSON, 2001; MOIR, 2003; SETLOW, 2003). Se uma destas etapas for bloqueada, esses esporos não conseguirão germinar, e não exercerão seu efeito deteriorador no alimento. Neste estudo, a bovicina HC5 inibiu a germinação de esporos de *B. cereus* e *B. thuringiensis* em meio sintético e reduziu a germinação em polpa de manga. Uma vez que a bovicina HC5 demonstrou efeito bactericida sobre células vegetativas inoculadas em polpa de manga, os esporos que germinarem podem não conseguir retomar o crescimento vegetativo devido a presença da bacteriocina. Esses resultados sugerem que a bovicina HC5 pode impedir que esporos de *Bacillus* isolados da polpa de manga deteriorada retomem crescimento vegetativo.

Estudos têm demonstrado que bacteriocinas, como a nisina e a enterocina AS-48, diminuem a resistência térmica de esporos de *Clostridium*, *Alicyclobacillus* e *Bacillus* (MAZZOTTA e MONTVILLE, 1999; YAMAZAKI *et al.*, 2000; GRANDE *et al.*, 2006). Segundo MAZZOTTA e MONTVILLE (1999), nisina induz a germinação de esporos, o que os torna mais sensíveis ao tratamento térmico. Uma vez que esses esporos entram na etapa de “*outgrowth*” para se converterem em célula vegetativa, a nisina forma poros na membrana da célula que está sendo formada, impedindo que esta retome crescimento vegetativo (MAZZOTTA e MONTVILLE, 1999). Estes autores afirmam que este é um mecanismo geral, pelo qual a nisina sensibiliza esporos ao calor.

No presente trabalho, a bovicina HC5 não teve efeito na diminuição da resistência térmica de esporos dos isolados de *Bacillus* utilizados. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a bovicina HC5 não possui o mesmo efeito da nisina, ativando a germinação de esporos. As camadas envoltórias do esporo funcionam como uma barreira protetora que podem impedir a ação da bovicina HC5 contra o esporo. Entretanto, considerando que a bovicina HC5 apresenta estabilidade a altas temperaturas (MANTOVANI *et al.*, 2002), esta bacteriocina poderá permanecer estável após o tratamento térmico e impedir que esses esporos retomem crescimento vegetativo, uma vez que o efeito dessa bacteriocina contra células vegetativas foi bactericida. Quando *A. acidoterrestris* DSMZ 2498 foi utilizado como cultura de

referência, foi observada redução em 77 % na resistência térmica de esporos desse microrganismo na presença da bovicina HC5. Este é um resultado importante, já que *A. acidoterrestris* é a bactéria deterioradora de maior resistência térmica que tem sido isolada de alimentos ácidos tratados termicamente (YAMAZAKI *et al.*, 2000; SILVA e GIBBS, 2001).

O aumento na resistência térmica de esporos de *B. thuringiensis* LMA09, *B. cereus* LMA19 e *B. thuringiensis* LMA65 na presença de nisina não coincide com os resultados obtidos por MAZZOTTA e MONTVILLE (1999) e YAMAZAKI *et al.* (2000) e sugere a necessidade de maior investigação do efeito desta bacteriocina sobre esporos bacterianos. Entretanto, a utilização de nisina contra *A. acidoterrestris*, resultou na diminuição na resistência térmica ($D_{80^{\circ}\text{C}}$) em 75 %, resultado semelhante ao obtido com a bovicina HC5. YAMAZAKI *et al.* (2000) também observaram diminuição de aproximadamente 75 % no valor $D_{90^{\circ}\text{C}}$ de esporos de *A. acidoterrestris* AB-5 inoculados em suco de laranja na presença de nisina.

A aplicação de bacteriocinas na preservação de alimentos pode ser limitada devido ao surgimento de culturas adaptadas ou mutantes resistentes em populações sensíveis (MAZZOTTA e MONTVILLE, 1997; COTTER *et al.*, 2005). Vários estudos têm demonstrado que células previamente sensíveis podem se tornar resistentes a ação de bacteriocinas, como a nisina e a pediocina PA1, por exemplo (MAZZOTTA e MONTVILLE, 1997; CRANDALL e MONTVILLE, 1998; ENNAHAR *et al.*, 2000; MANTOVANI e RUSSELL, 2001). Neste estudo, culturas de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *Clostridium* spp. transferidas sucessivamente na presença de bovicina HC5, em concentrações sub-letais, não conseguiram crescer na presença de doses previamente inibitórias. Esse resultado indica que resistência à bovicina HC5 não é prontamente adquirida por microrganismos sensíveis. Resultados similares foram obtidos em outros estudos utilizando diferentes microrganismos alvo (MANTOVANI e RUSSELL, 2002; 2003).

Embora várias bacteriocinas com potencial de utilização em alimentos já terem sido purificadas e caracterizadas, a nisina e, em uma extensão menor, a pediocina PA-1 são os únicos peptídeos antimicrobianos produzidos comercialmente (COTTER *et al.*, 2005). Para a aprovação de uma bacteriocina para uso em alimentos, vários fatores

devem ser considerados. A bacteriocina precisa ser quimicamente identificada e caracterizada. O processo de sua obtenção deve ser descrito e seu uso e eficácia em alimentos, bem como testes utilizados para quantificação e padronização do peptídeo, devem ser demonstrados. Análises relacionadas ao efeito tóxico e alergênico e ao destino da bacteriocina após ingestão também são necessárias (CLEVELAND *et al.*, 2001). Outras características que também devem ser consideradas é que a bacteriocina deve apresentar estabilidade a altas temperaturas e apresentar atividade contra microrganismos patogênicos, como *L. monocytogenes* e *C. botulinum* (HOLZAPFEL *et al.*, 1995; RODRÍQUEZ *et al.*, 2002). A bovicina HC5 já atende alguns desses requisitos, como a caracterização e identificação química. Sua efetividade contra *L. monocytogenes* também já foi demonstrada e o processo de sua obtenção é descrito (MANTOVANI e RUSSELL, 2002).

Neste trabalho, a bovicina HC5 demonstrou ser tão efetiva quanto a nisina contra espécies de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. isolados de polpa de manga deteriorada, tanto em meio complexo quanto em polpa de manga. A bovicina HC5 foi efetiva contra esporos de *Bacillus*, reduzindo a germinação. Esse resultado indica que, uma vez presente na polpa de manga, a bovicina HC5 pode inibir a ação deterioradora destes microrganismos.

Tais resultados, juntamente com o fato da bovicina HC5 apresentar estabilidade a altas temperaturas e ao sobrenadante das culturas e a polpa de manga e de ser mais efetiva em pH baixo, cria a possibilidade de sua aplicação como conservante neste produto. Levando em consideração que o *S. bovis* HC5 possui baixo requerimento nutricional e apresenta alta velocidade específica de crescimento em várias condições, a obtenção da bovicina HC5 é mais acessível do que as bacteriocinas que têm sido comumente estudadas, que geralmente são produzidas por bactérias lácticas fastidiosas. Entretanto, testes relacionados com o efeito citotóxico e alergênico desta bacteriocina ainda terão que ser realizados. Mais estudos demonstrando sua efetividade em outros tipos de alimentos contra outros patógenos alimentares também terão de ser realizados.

6. CONCLUSÕES

- O extrato de bovicina HC5 foi estável à polpa de manga e ao sobrenadante da cultura dos microrganismos isolados da polpa de manga deteriorada;
- O efeito da bovicina HC5 contra células vegetativas de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *C. tyrobutyricum* foi bactericida e mais pronunciado em valores de pH baixo;
- A bacteriocina reduziu a germinação de esporos das linhagens de *Bacillus* e inibiu a produção de gás por *C. tyrobutyricum* ;
- A transferência das linhagens de *Bacillus* e *Clostridium* na presença de bovicina HC5 não causou adaptação dos microrganismos;
- A bovicina HC5 não teve efeito na resistência térmica das linhagens de *Bacillus*, mas pode reduzir a germinação dos esporos que permanecerem viáveis após o tratamento térmico e impedir que esses esporos retomem crescimento vegetativo;
- A bovicina HC5 foi tão efetiva quanto a nisina contra microrganismos deterioradores e patogênicos isolados da polpa de manga;
- Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que esta bacteriocina pode ser aplicada na preservação de polpa de manga.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**. v 28, p. 169– 185, 1995.

ALTENA, K.; GUDER, A.; CRAMER, C.; BIERBAUM, G. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type lantibiotic gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**. v 66, p. 2565– 2571, 2000.

AZEREDO, R. M. C.; VANETTI, M. C. D.; LEITÃO, M. F. F. Estimativas de valores $D_{95\text{ }^{\circ}\text{C}}$ de esporos de *Bacillus cereus* submetidos a tratamento térmico de cozimento de arroz. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v 16, p. 107-111, 2002.

AZIZI, A.; RANGANNA, S. Spoilage organisms of canned acidified mango pulp and their relevance to thermal processing of acid foods. **Journal of Food Science and Technology**. v 30, p. 241-245, 1993.

BENNETT, R. W.; BELAY, M. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th, American Public Health Association, cap. 32, p. 311-316, 2001.

BREUKINK, E.; KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, a special case or not ? **Biochemical et Biophysical Acta**. v 1462, p. 223-234, 1999.

CAPILICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentation's: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**. v 50, p. 131-149, 1999.

CARNEIRO de MELO, A. M. S.; COOK, G. M.; MILES, R. J.; POOLE, R. K. Nisin stimulates oxygen consumption by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. v 62, p. 1831-1834, 1996.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**. v 28, p. 281 –370, 2002.

CERF, O.; DAVEY, K. R.; SADOUDI, A. K. Thermal inactivation of bacteria: a new predictive model for the combined effect of three environmental factors: temperature, pH and water activity. **Food Research International**. v 29, p. 219-226, 1996.

CLEVELAND J.; MONTVILLE T. J.; NES, I. F.; CHIKINDA M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**. v 71, p. 1-20, 2001.

COLLADO, J.; FERNÁNDEZ, A.; RODRIGO, M.; MARTÍNEZ, A. Modelling the effect of heat shock and germinant concentration on spore germination of a wild strain of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**. v 106, p. 85-89, 2005.

COSTA, E. D. Isolamento, caracterização e atividade fermentativa de bactérias deterioradoras de polpa de manga. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 55 p, 2006.

COTTER, P. D.; HILL C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews**. v 3, p.777-788, 2005.

CRANDALL, A. D.; MONTVILLE, T. J. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. **Applied and Environmental Microbiology**. v 64, p. 231–237, 1998.

DALET, K.; CENATIEMPO, Y.; COSSART, P.; HÉCHARD, Y. A sigma(54)-dependent PTS permease of the manose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y 105. **Microbiology**. 147, p.3263-3269, 2001.

DE MAN J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**. v 23, p. 130-135, 1960.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**. v. 16, 1058-1071, 2006.

DE JONG, J. Spoilage of an acid food product by *Clostridium perfringens*, *C. barati* and *C. butyricum*. **International Journal of Food Microbiology**. v 8, p 121-132,1989.

DE PAULA, R. A. Atividade inibidora em bactérias lácticas e produção de bacteriocinas. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 47 p., 2000.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**. v 14, p. 273-285, 2004.

DIRIX, G.; MONSIEURS, P.; DOMBRECHT, B.; DANIELS, R.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. **Peptides**. v 25, p. 1425–1440, 2004.

DOELLE, H.W. **Bacterial metabolism**. 2 ed. Academic Press: New York, 1975, 738 p.

ENGELKE, G.; GUTOWSKI-ECKEL, Z.; HAMMELMANN, M. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB. **Applied and Environmental Microbiology**. v 58, p. 3730–3743, 1992.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIA bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**. v 24, p. 85-106, 2000.

EVERIS, L.; BETTS, G. pH stress can cause cell elongation in *Bacillus* and *Clostridium* species: a research note. **Food Control**. v 12, p. 53-56, 2002.

FLYTHER, M. D.; RUSSELL, J. B. The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**. v 47, p. 215-222, 2004.

GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**. v 46, p. 207–217, 1999.

GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; MAQUEDA, M.; MARTINEZ-BUENO, M.; MARTINEZ-CAÑAMERO; VALDÍVIA, E.; GÁLVEZ, A. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**. v 104, p. 289-297, 2005.

GRANDE, M. J.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B.; MAQUEDA, M.; MARTINEZ-BUENO, M.; MARTINEZ-CAÑAMERO; GÁLVEZ, A. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology**. v 106, p. 185-194, 2006.

HÉCHARD, Y.; PELLETIER, C.; CENATIEMPO, Y.; FRERE, J. Analysis of sigma(54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a manose PTS permease (EII(Man)) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. **Microbiology**. 147, p. 1575-1580, 2001.

HÉCHARD, Y.; SAHL, H. G. Mode of action of modified e unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie**. v 84, p. 1-13, 2002.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**. v 60, p. 153–161, 2000.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th ed., Baltimore, USA: The Williams & Wilkins Co, 1994.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**. v 24, p. 343–362, 1995.

HOOVER, D. G.; HARLANDER, S. K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: HOOVER, D. G.; STEENSON, L. R. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Food Science and Technology**. p 23-39, 1993.

HOULIHAN, A. J.; MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **FEMS Microbiology Letters**. v 231, p. 27-32, 2004.

IURLINA, M. O.; SAIZ, A. I.; FUSELLI, S. R.; FRITZ, R. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argetina. **LWT**. v 39, p. 105-110, 2006.

JENSEN, N.; WHITFIELD, F. B. Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. **Letters in Applied Microbiology**. v 36, p 9-14, 2003.

KOMITOPOULOU, E.; BOZIARIS, I. S.; DAVIES, E. A.; DELVES-BOUGHTON, J.; ADAMS, M. R. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. **International Journal of Food Science and Technology**. v 34, p. 81-85, 1999.

LADO, B. H.; YOUSEF, A. E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**. v 4, p. 433-440, 2002.

LEE, S. S.; HSU, J. T.; MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production in vitro. **FEMS Microbiology Letters**. v 217, p. 51 –55, 2002.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v 67, p. 808-813, 2001.

MANTOVANI, H. C. **Bacteriocin production and resistance in *Streptococcus bovis***. Ithaca, NY: Cornell University. Philosophy Doctor. 142 p., 2002.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. The ability of a bacteriocin of *Streptococcus bovis* HC5 (bovicin HC5) to inhibit *Clostridium aminophilum*, an obligate amino acid fermenting bacterium from the rumen. **Anaerobe**. v 8, p. 247-252, 2002.

MANTOVANI, H. C.; HU, H.; WOROBO, R. W.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**. v 148, p. 3347 –3352, 2002.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International Journal of Food Microbiology**. v 89, p.77-83, 2003.

MAZZOTTA, A. S.; MONTVILLE, T. J. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. **Journal of Applied Microbiology**. v 82, p. 32-38, 1997.

MAZZOTTA, A. S.; MONTVILLE, T. J. Characterization of fatty acid composition, spore germination, and thermal resistance in a nisin-resistant mutant of *Clostridium botulinum* 169B and in the wild-type strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v 65, p. 659-664, 1999.

MCAULIFFE, O.; ROOS, R. P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**. v 25, p. 285-308, 2001.

MCINTYRE, S., IKAWA, J. Y., PARKINSON, N., HAGLUND, J.; LEE, J. Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. **Journal of Food Protection**. v 58, p. 319-321, 1995.

MOIR, Anne. Bacterial spore germination and protein mobility. **TRENDS in Microbiology**. v 11, p. 452-454, 2003.

MOLL, G. N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**. v 76, p. 185-198, 1999.

MONTVILLE, T. J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied and Microbial Biotechnology**. v 50, p. 511-519, 1998.

MORAES, C. A.; GOMES, A. P. Segurança alimentar na produção de manga. In: **Manga: produção integrada, industrialização e comercialização**. Editores: ROZANE, D. E. *et al.* Viçosa: UFV, 2004, p. 533-551.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th, American Public Health Association, cap. 7, p. 63-67, 2001.

MURAKAMI, M.; TEDZUKA, H.; YAMAZAKI, K. Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. **Food Microbiology**. v 15, p. 577-582, 1998.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M. B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. R. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v 70, p. 113-128, 1996.

NCHE, P.F.; NOUT, M.J.R.; ROMBOUTS, F.M. Gas production by *Clostridium perfringens* as a measure of the fermentability of carbohydrates and processed cereal-legume foods. **International Journal of Food Microbiology**. v 11, p. 21-29, 1994.

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**. v 84, p. 51-61, 1998.

ONDA, T.; YANAGIDA, F.; TSUJI, M.; SHINOHARA, T.; YOKOTSUKA, K. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus spp.* strain GM005, isolated from miso-paste. **International Journal of Food Microbiology**. v 87, p. 153– 159, 2003.

PALOP, A.; RASO, J.; MARCO, A.; CONDÓN, S.; SALA, F. J. Survival of heated *Bacillus coagulans* in a medium acidified with lactic or citric acid. **International Journal of Food Microbiology**. v 29, p. 1-10, 1996.

PAO, S.; BROWN, G. E. Reduction of microorganisms on citrus fruit surfaces during packinghouse processing. **Journal of Food Protection**. v 61, p. 903-906, 1998.

PETTIPHER, G. L.; OSMUNDSON, M. E.; MURPHY, J. M. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. **Letters in Applied Microbiology**. v 24, p 185-189, 1997.

RODRÍGUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, M. I.; HORN, N.; DODD, H. M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v 80, p. 101–116, 2002.

ROLLER, S. Physiology of food spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**. v 50, p. 151-153, 1999.

ROSENQUIST, H.; SMIDR, L.; ANDERSEN, S. R.; JENSEN, G. B.; WILCKES, A. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. **FEMS Microbiology Letters**. v 250, p. 129-136, 2005.

RUSSELL, J. B.; MANTOVANI, H. C. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. v 4, p. 347–355, 2002.

SETLOW, P.; JOHNSON, E. A. Spores and their significance. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J.. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM Press. 2th ed., p. 30-65, 2001.

SETLOW, P. Spore germination. **Current Opinion in Microbiology**. v 6, p. 550-556, 2003.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science and Technology**. v 7, p. 158-164, 1996.

SILVA, D. A. **Resistência de esporos bacterianos em néctar e suco de manga**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 55 p, 2000.

SILVA, F. M.; GIBBS, P.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit processes. **International Journal of Food Microbiology**. v 51, p. 95-103, 1999.

SILVA, F. M.; GIBBS, P. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization process. **Trends in Food Science and Technology**. v 12, p. 68-74, 2001.

SIRAGUSA, G. R.; CUTTER, C. N.; WILLETT, J. L. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. **Food Microbiology**. v 16, 229-235, 1999.

STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. v 70, p. 331–345, 1996.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriology Review**. v 40, 722 –756, 1976.

VIEIRA, M. C.; TEIXEIRA, A. A.; SILVA, F. M.; GASPAR, N.; SILVA, C. L. M. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) néctar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. **International Journal of Food Microbiology**. v 77, p. 71-81, 2002.

WHITFORD, M. F., MCPHERSON, M. A., FORSTER, R. J.; TEATHER, R. M. Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. **Applied and Environmental Microbiology**. v 67, p. 569-574, 2001.

WILKES, J. G.; CONTE, E. D.; KIM, Y.; HOLCOMB, M.; SUTHERLAND, J. B.; MILLER D. W. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in Foods. **Journal of Chromatography A**.v 880, p. 3–33, 2000.

YARMUS, M., METT, A., SHAPIRA, R. Cloning and expression of the genes involved in the production of and immunity against the bacteriocin lactacin RM. **Biochimica et Biophysica Acta**. v 1490, p. 279-290, 2000.

YAMAZAKI, K.; TEDUKA, H.; SHINANO, H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v 60, p. 543-545, 1996.

YAMAZAKI, K.; MURAKAMI, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; MATSUDA, T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. **International Journal of Food Microbiology**. v 17, p. 315-320, 2000.

APÊNDICE

Tabela 1A. Equações ajustadas ao logaritmo do número de esporos das linhagens de *Bacillus* isoladas da polpa de manga deteriorada em função do tempo, na ausência de bacteriocina e na presença de bovicina HC5 e nisina

Isolado	Tratamento (80 °C)	Equação	R ²
<i>B. thuringiensis</i> LMA09	Controle	Log (Y) = 9,0786 – 0,1755x	0,9966
	Bovicina HC5	Log (Y) = 8,9529 – 0,1831x	0,9975
	Nisina	Log (Y) = 8,9033 – 0,1392x	0,9824
<i>B. cereus</i> LMA19	Controle	Log (Y) = 9,2495 – 0,1714x	0,9864
	Bovicina HC5	Log (Y) = 9,0786 – 0,1755x	0,9966
	Nisina	Log (Y) = 8,8876 - 0,1335x	0,9812
<i>B. thuringiensis</i> LMA65	Controle	Log (Y) = 9,1571 - 0,1774x	0,9911
	Bovicina HC5	Log (Y) = 8,8095 - 0,1582x	0,9891
	Nisina	Log (Y) = 8,7133 - 0,1641x	0,9784
<i>Alicyclobacillus</i> <i>acidoterrestris</i> DSMZ 2498	Controle	Log (Y) = 6,4286 - 0,0248x	0,6898
	Bovicina HC5	Log (Y) = 4,8571 - 0,1086x	0,9377
	Nisina	Log (Y) = 4,6191 - 0,1029x	0,8679

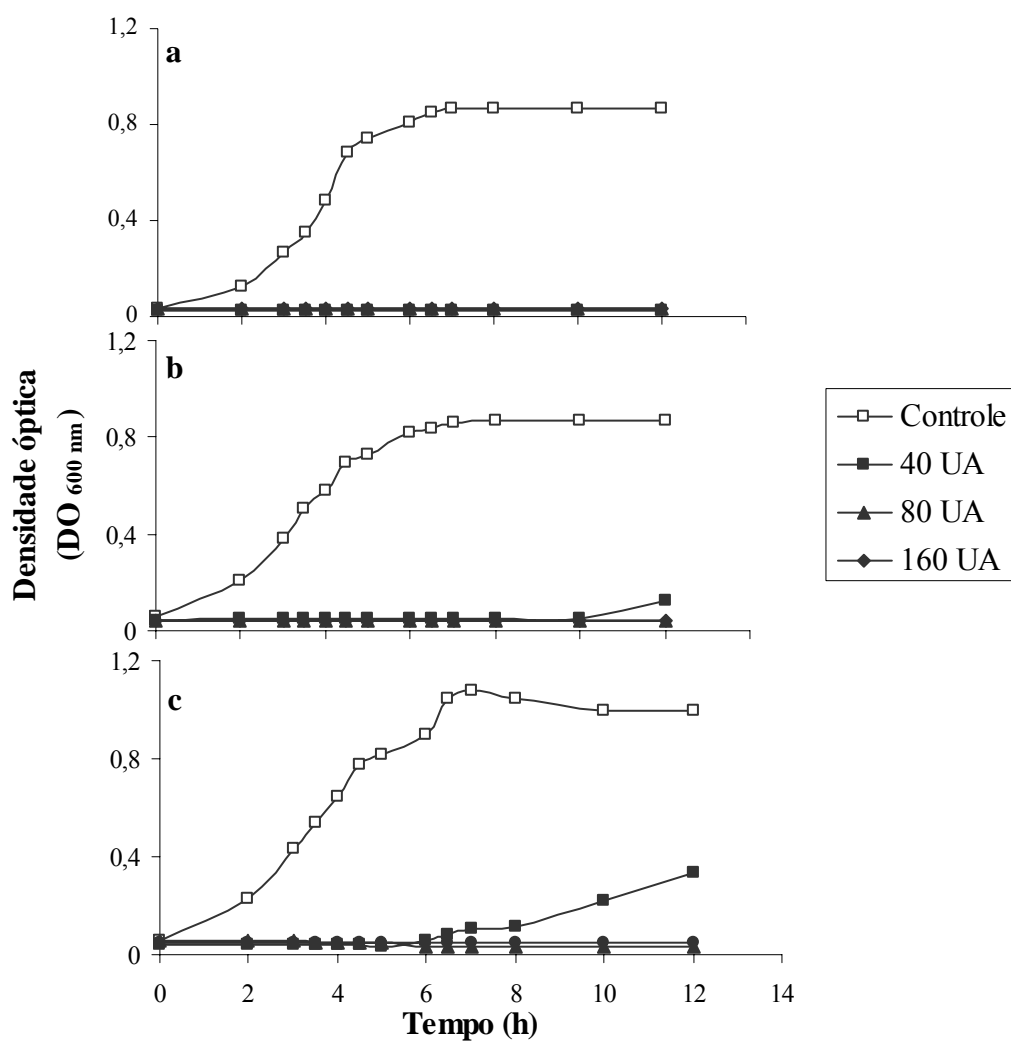


Figura 1A. Efeito de bovicina HC5 no crescimento de *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c) em caldo BHI. Células em fase estacionária (aproximadamente 10^6 UFC/mL) de cada isolado foram inoculadas em meio BHI contendo bovicina HC5 nas concentrações de 40 a 160 UA/mL. Tratamento controle sem bacteriocina também é mostrado. Os tubos foram incubados a 30 °C e o crescimento foi monitorado pela leitura da DO a 600 nm.

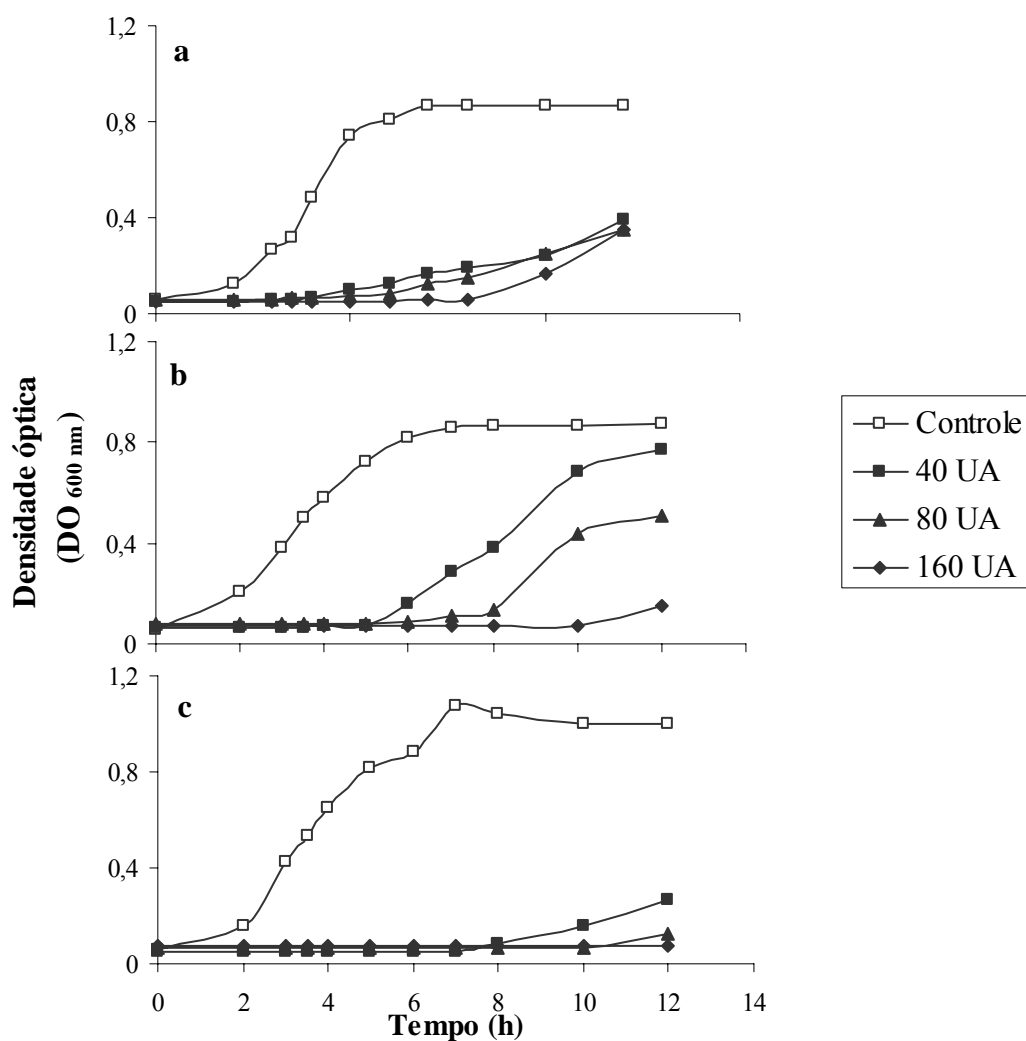


Figura 2A. Efeito de nisina no crescimento de *B. thuringiensis* LMA09 (a), *B. thuringiensis* LMA65 (b) e *B. cereus* LMA19 (c) em caldo BHI. Células em fase estacionária (aproximadamente 10^6 UFC/mL) de cada isolado foram inoculadas em caldo BHI contendo nisina nas concentrações de 40 a 160 UA/mL. Tratamento controle sem bacteriocina também é mostrado. O crescimento foi monitorado pela leitura da DO a 600 nm e os tubos foram incubados a 30 °C.

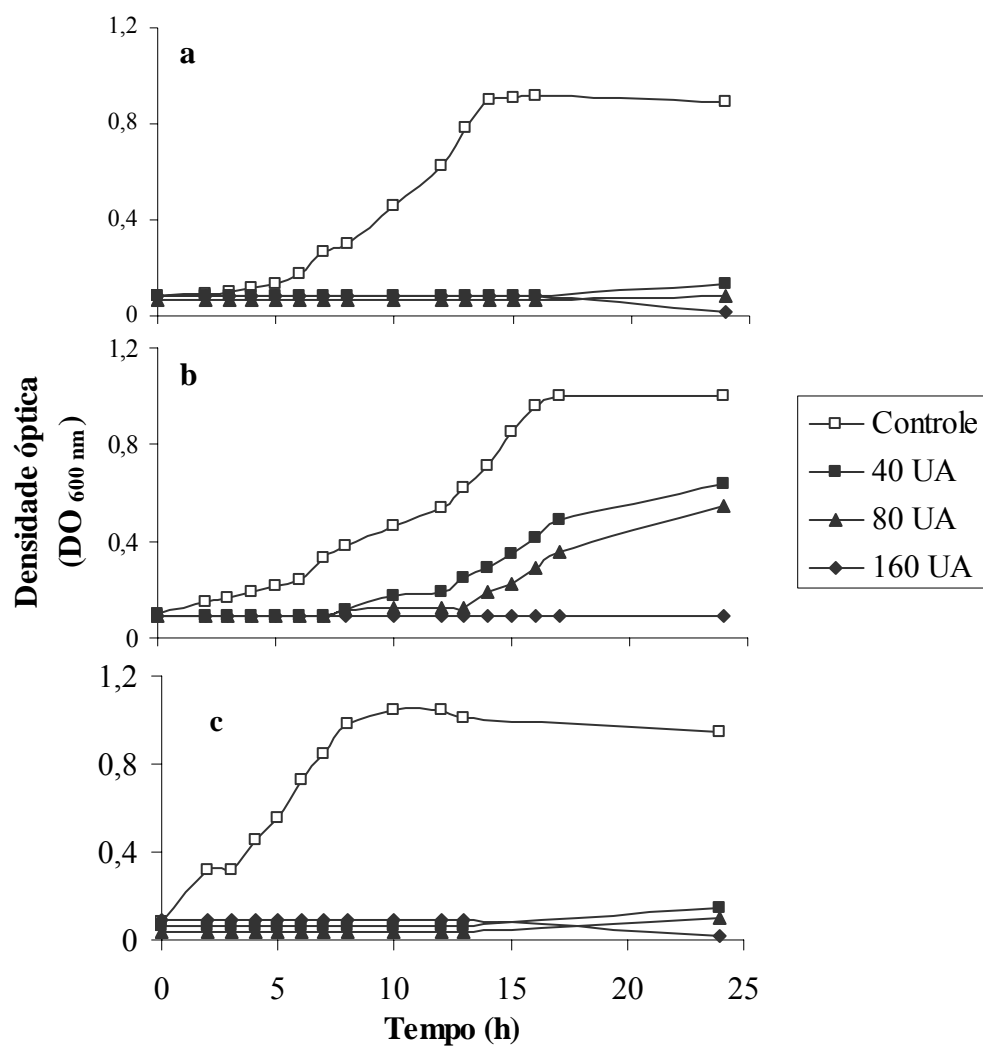


Figura 3A. Efeito de bovicina HC5 no crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c) em caldo BHI. Células em fase estacionária (aproximadamente 10^6 UFC/mL) foram inoculadas em meio BHI contendo bovicina HC5 nas concentrações de 40, 80 e 160 UA/mL. Tratamento controle sem bacteriocina também é mostrado. O crescimento foi monitorado pela leitura da DO a 600 nm e os tubos foram incubados a 30 °C.

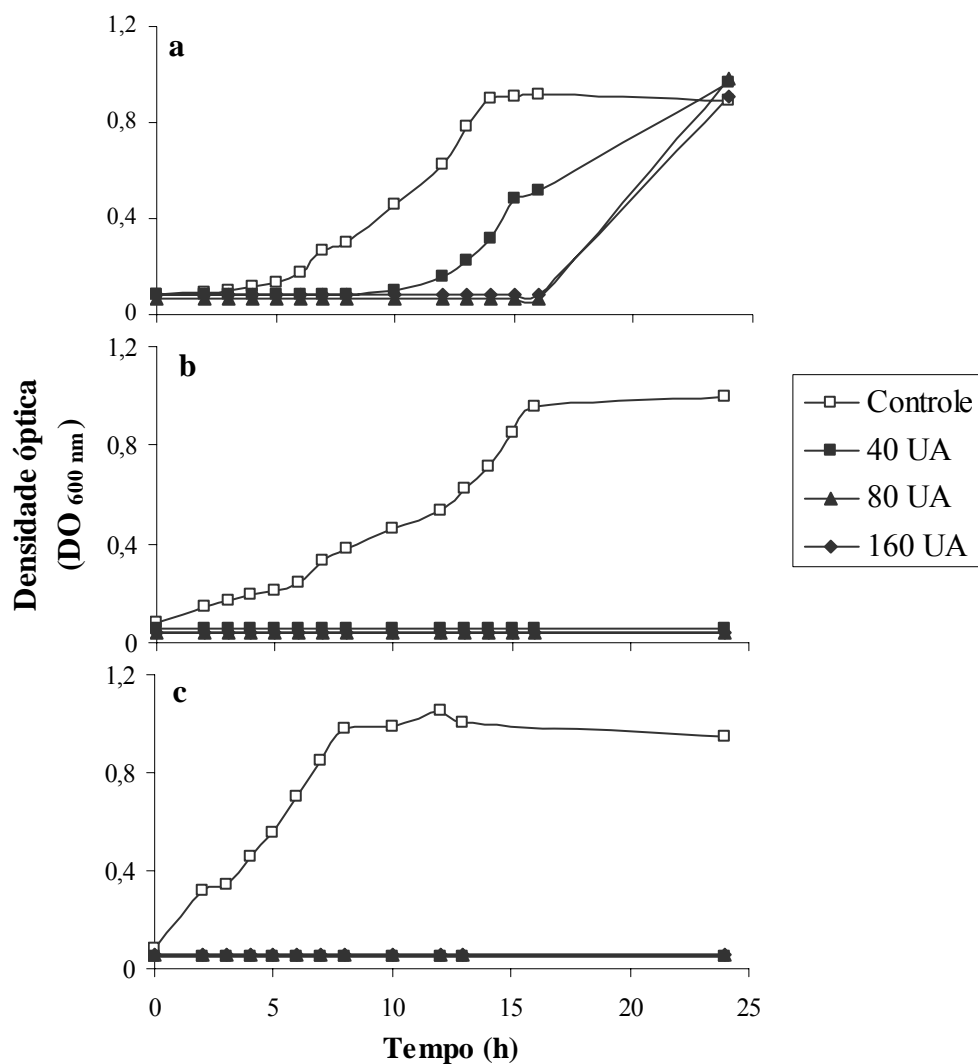


Figura 4A. Efeito de nisina no crescimento de *C. tyrobutyricum* LMA45 (a), LMA63 (b) e LMA72 (c) em caldo BHI. Células em fase estacionária de cada isolado (aproximadamente 10^6 UFC/mL) foram inoculadas em caldo BHI contendo nisina nas concentrações de 40 a 160 UA/mL. Tratamento controle sem bacteriocina também é mostrado. O crescimento foi monitorado pela leitura da densidade óptica a 600 nm e os tubos foram incubados a 30 °C.

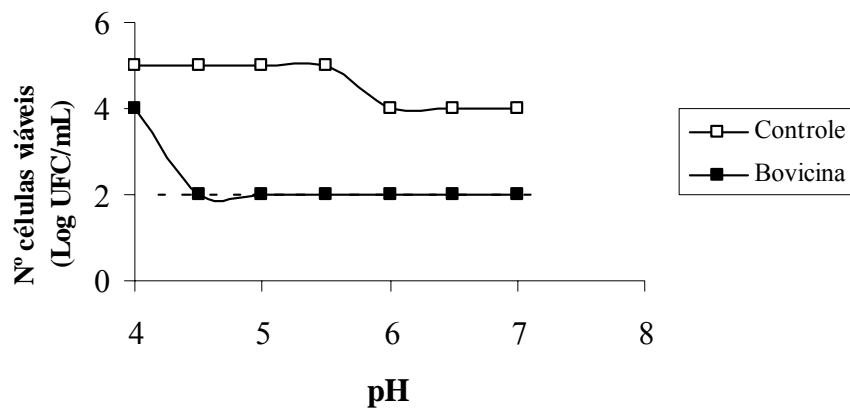


Figura 5A. Número de células viáveis de *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSMZ 2498 inoculado (10^6 UFC/mL) em polpa de manga com diferentes valores de pH. Bovicina HC5 foi adicionada na concentração de 100 UA/mL. Controle sem bacteriocina também é mostrado. Após 12 h de incubação a 30 °C, o número de células viáveis foi determinado. A linha pontilhada indicada o limite de detecção. O desvio padrão das médias foi inferior a 10 %.

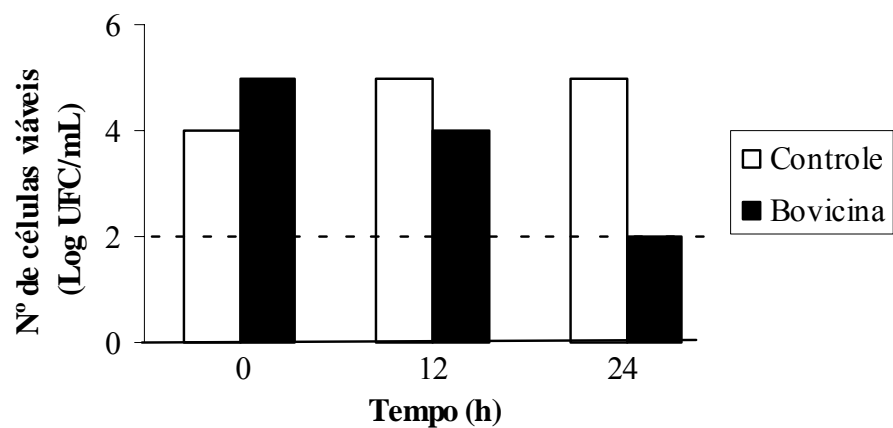


Figura 6A. Efeito bactericida da bovicina HC5 contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSMZ 2498 em polpa de manga com pH 4,0. Aproximadamente 10^6 UFC/mL de *A. acidoterrestris* foram inoculadas em polpa de manga na ausência de bacteriocina (controle) e na presença de 100 UA/mL de bovicina HC5. Nos tempos 0, 12 e 24 h de incubação a 30 °C, alíquotas foram retiradas e o número de células viáveis foi determinado. A linha pontilhada indicada o limite de detecção. O desvio padrão das médias foi inferior a 10 %.